

Aus dem Max-Planck-Institut
für Ernährungsphysiologie, Dortmund
Direktor: Professor Dr. Benno Hess

Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten der mitochondrialen F1-ATPase aus Hefe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät der Abteilung für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

Helmut Begusch
aus Klagenfurt (Österreich)

Bochum 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut
für Ernährungsphysiologie, Dortmund
Direktor: Professor Dr. Benno Hess

Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten der mitochondrialen F1-ATPase aus Hefe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät der Abteilung für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

Helmut Begusch

aus Klagenfurt (Österreich)

Bochum 1980

Van der Waals, J. D.
De Aantrekkingskrachten
tusschen Moleculen
en Atomen.

Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten der mitochondrialen F₁-ATPase aus Hefe

Thema:
Die Isolation und Charakterisierung
der Untereinheiten der mitochondrialen
F₁-ATPase aus Hefe.



Verfasser:
J. D. van der Waals

Leiden, 1980

1.1	Einleitung	1
1.2	Zusammenfassung	2
1.3	Abkürzungen	3
1.4	Abkürzungen	4
1.5	Abkürzungen	5
1.6	Abkürzungen	6
1.7	Abkürzungen	7
1.8	Abkürzungen	8
1.9	Abkürzungen	9
1.10	Abkürzungen	10
1.11	Abkürzungen	11
1.12	Abkürzungen	12
1.13	Abkürzungen	13
1.14	Abkürzungen	14
1.15	Abkürzungen	15
1.16	Abkürzungen	16
1.17	Abkürzungen	17
1.18	Abkürzungen	18
1.19	Abkürzungen	19
1.20	Abkürzungen	20
1.21	Abkürzungen	21
1.22	Abkürzungen	22
1.23	Abkürzungen	23
1.24	Abkürzungen	24
1.25	Abkürzungen	25
1.26	Abkürzungen	26
1.27	Abkürzungen	27
1.28	Abkürzungen	28
1.29	Abkürzungen	29
1.30	Abkürzungen	30
1.31	Abkürzungen	31
1.32	Abkürzungen	32
1.33	Abkürzungen	33
1.34	Abkürzungen	34
1.35	Abkürzungen	35
1.36	Abkürzungen	36
1.37	Abkürzungen	37
1.38	Abkürzungen	38
1.39	Abkürzungen	39
1.40	Abkürzungen	40
1.41	Abkürzungen	41
1.42	Abkürzungen	42
1.43	Abkürzungen	43
1.44	Abkürzungen	44
1.45	Abkürzungen	45
1.46	Abkürzungen	46
1.47	Abkürzungen	47
1.48	Abkürzungen	48
1.49	Abkürzungen	49
1.50	Abkürzungen	50
1.51	Abkürzungen	51
1.52	Abkürzungen	52
1.53	Abkürzungen	53
1.54	Abkürzungen	54
1.55	Abkürzungen	55
1.56	Abkürzungen	56
1.57	Abkürzungen	57
1.58	Abkürzungen	58
1.59	Abkürzungen	59
1.60	Abkürzungen	60
1.61	Abkürzungen	61
1.62	Abkürzungen	62
1.63	Abkürzungen	63
1.64	Abkürzungen	64
1.65	Abkürzungen	65
1.66	Abkürzungen	66
1.67	Abkürzungen	67
1.68	Abkürzungen	68
1.69	Abkürzungen	69
1.70	Abkürzungen	70
1.71	Abkürzungen	71
1.72	Abkürzungen	72
1.73	Abkürzungen	73
1.74	Abkürzungen	74
1.75	Abkürzungen	75
1.76	Abkürzungen	76
1.77	Abkürzungen	77
1.78	Abkürzungen	78
1.79	Abkürzungen	79
1.80	Abkürzungen	80
1.81	Abkürzungen	81
1.82	Abkürzungen	82
1.83	Abkürzungen	83
1.84	Abkürzungen	84
1.85	Abkürzungen	85
1.86	Abkürzungen	86
1.87	Abkürzungen	87
1.88	Abkürzungen	88
1.89	Abkürzungen	89
1.90	Abkürzungen	90
1.91	Abkürzungen	91
1.92	Abkürzungen	92
1.93	Abkürzungen	93
1.94	Abkürzungen	94
1.95	Abkürzungen	95
1.96	Abkürzungen	96
1.97	Abkürzungen	97
1.98	Abkürzungen	98
1.99	Abkürzungen	99
1.100	Abkürzungen	100

F Ü R E V I

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Material	5
2.2. Methoden	7
2.2.1. Geräte	7
2.2.2. Präparation der mitochondrialen F_1 -ATPase	8
2.2.3. ATPase-Aktivitätsmessungen	9
2.2.3.1. Gekoppelter Enzymtest	9
2.2.3.2. pH-stat-Messung	9
2.2.4. Proteinbestimmungen	10
2.2.5. Präparation der Untereinheiten	10
2.2.5.1. LiCl-Fällung	10
2.2.5.2. Herstellung von Slab-Gradienten-Gelen	11
2.2.5.3. Präparative-Slab-Gradienten PAGE	11
2.2.5.4. Nachweis und Extraktion	12
2.2.6. Mikro-Disc-Elektrophorese (MDE)	12
2.2.7. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	13
2.2.8. Mini-Slab-Gradienten PAGE	14
2.2.9. Disc-Elektrophorese (DE)	14
2.2.10. Endgruppenanalysen	15
3. Resultate	16
3.1. Homogenität und Zusammensetzung der F_1 -ATPase	16
3.2. Dissoziationsexperimente	21
3.2.1. Chemische Dissoziation der F_1 -ATPase	21
3.2.2. Kältelabilität	25
3.3. Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten	28
3.3.1. Isolierung der α - und γ -Untereinheiten	28
3.3.2. Isolierung der β -Untereinheit	33

3.3.3.	Charakterisierung der Untereinheiten α , β und γ	34
3.3.3.1.	Molekulargewichte	34
3.3.3.2.	Isoelektrische Fokussierung	37
3.3.3.3.	Endgruppen	37
3.3.3.4.	Aminosäureanalysen	40
3.3.3.5.	Spektroskopische Eigenschaften	41
3.3.3.6.	Identität der Komponente X und der α -Untereinheit	44
3.4.	Mechanismus der Dissoziation und Renaturierung	44
3.4.1.	Enzymatische Aktivität bei Inaktivierung	44
3.4.2.	Laserlichtstreuung an der F_1 -ATPase	48
3.4.3.	Untereinheiten-Dissoziation-Assoziation	53
4.	Diskussion	56
5.	Zusammenfassung	63
6.	Literatur	64

ABKÜRZUNGEN

Bisacrylamid	N,N',-Methylenbisacrylamid
DABITC	4-N,N,-dimethylaminoazobenzol-4'-isothio- cyanat
DE	Disc-Elektrophorese
DTT	Dithiothreitol
HAc	Essigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
MeOH	Methanol
MDE	Micro-Disc-Elektrophorese
2-ME	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht (K bedeutet 1000)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
pI	Isoelektrischer Punkt
T(%)	Acrylamid + Bisacrylamid/100ml Lösung x 100
C(%)	Gramm Bisacrylamid/T x 100
R _M	Relative Mobilität

1. EINLEITUNG

Die H^+ -Translokations-ATPase (H^+ -ATPase) katalysiert den terminalen Transphosphorylierungsschritt der ATP-Bildung aus ADP und Phosphat in der oxidativen, wie in der Photophosphorylierung, die in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien gefunden wird (Reviews 1-10).



Das Enzym ist reversibel d.h. es bildet ATP (ATP-Synthetase) bzw. spaltet ATP(ATPase), wobei die Reaktionsrichtung von der Kopplung der ATPase an die energietransduzierende Membran (innere Mitochondrienmembran) abhängt. Neben der Funktion der H^+ -ATPase in der oxidativen bzw. Photophosphorylierung ist das Enzym an anderen Prozessen wie z.B. an dem reversiblen Elektronentransport (11), an der NADP-Reduktion und an der molekularen Genexpression (12) beteiligt.

Der molekulare Mechanismus der ADP-Phosphorylierung ist bisher noch unbekannt. Es gibt jedoch einige Theorien (13-22), welche den Prozess zu beschreiben versuchen. Nach der chemiosmotischen Theorie kommt die Energie für die ATP-Synthese aus einem Protonengradient (und/oder Potential) der durch die Elektronentransportketten aufgebaut wird. Umgekehrt kann bei einem ATP-Überschuß durch Hydrolyse von ATP ein Protonengradient aufgebaut werden. Der molekulare Kopplungsmechanismus der H^+ -ATPase mit der Elektronentransportkette in den energietransduzierenden Membranen ist nicht bekannt.

Die ATP-Synthetase besteht aus einem membrangebundenen Teil (F_0) und einem abdissoziierbaren, löslichen oligomeren Protein (F_1 -ATPase oder Kopplungsfaktor F_1). Beide Teile sind über ein basisches Protein (auch "stalk" genannt) miteinander verbunden (23-44).

Der Membranteil F_0 (45-49) dient als Protonenkanal. Er besteht aus hydrophoben, membranintegrierten, basischen Proteinen. Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), von dem gezeigt wurde, daß es an das "stalk"-Protein bindet, hemmt sowohl die oxidative, als auch die Photo-phosphorylierung indem es den Protonenfluß durch den Membranteil- F_0 blockiert.

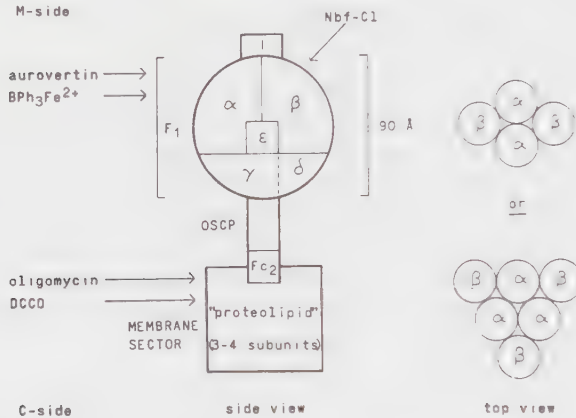


Abb. 1.:
Untereinheiten Topologie und Inhibitoren der mitochondrialen ATPase. I, ATPase Inhibitor-protein; Nbf-Cl, 4chloro-7-nitrobenzofurazan; BPh_3Fe^{2+} , tris-bathophenanthroline- Fe^{2+} -chelate.

Der hydrophile Teil, die F_1 -ATPase, kann in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in fünf verschiedene Proteinbanden (α - ϵ) mit Molekulargewichten von 8-60 000 aufgetrennt werden. In einigen ATPase-Präparationen wurde zusätzlich zu den fünf Untereinheiten noch ein ATPase-Inhibitorprotein (50-68) isoliert, welches hitzestabil, doch gegen tryptische Spaltung empfindlich ist. An den beiden großen Untereinheiten (α und β) lassen sich Nukleotidbindungsstellen (69-74) nachweisen. Die Anzahl, Lokali-

sation und ihre Funktion sind unklar. Durch differentielle Inhibitorstudien an der mitochondrialen und cytoplasmatischen Proteinbiosynthese wurde gezeigt, daß die F_1 -ATPase-Untereinheiten extramitochondrial und die Untereinheiten des Membranteils F_0 mitochondrial synthetisiert werden (75-92).

Im Gegensatz zur membrangebundenen ATPase ist die lösliche F_1 -ATPase kältelabil. Sie verliert während der Kälteinkubation die ATP-Hydrolyse-Aktivität, die Kopplungsfaktor-Aktivität und dissoziiert in verschiedene Komplexe. Diese Eigenschaften sind ein gemeinsames Charakteristikum von vielen löslichen ATPasen (93-105).

Eine genauere Aufklärung des molekularen Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung, sowie der biologischen ATP-Synthese schlechthin setzt jedoch eine komplette Struktur- aufklärung der F_1 -ATPase voraus. Die großen Untereinheiten (α, β), die den Hauptteil der F_1 -ATPase ausmachen, enthalten Nukleotidbindungsstellen (27,73), die eine wichtige Rolle in der ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese spielen. Darüberhinaus weiß man, daß die eigentliche ATP-Synthese an diesen Komponenten geschieht. Die Erforschung beider Bestandteile ist daher für die Aufklärung des ATP-Hydrolyse und -Synthese-Mechanismus von großer Wichtigkeit.

Diese Arbeit nun beschreibt die Isolierung und Charakterisierung der beiden großen Untereinheiten (α und β) der mitochondrialen F_1 -ATPase aus Hefe (*S. cerevisiae*). Die Untereinheiten von ATPasen anderer Organismen sind zum Teil in roher Form isoliert worden (106-126). Hefe wurde aus verschiedenen Gründen gewählt, denn es handelt sich um einen niederen nicht toxischen Eukaryoten, der in großen Mengen hergestellt werden kann; es lassen sich außerdem Mutanten züchten; schließlich führten in diesem

Laboratorium in der Vergangenheit eine ganze Reihe funktioneller Untersuchungen zu Ergebnissen, die an dem isolierten Material überprüft werden können.

Weiterhin soll die Dissoziation des Enzyms in seine Untereinheiten durch verschiedene Reagenzien bzw. Kälte genauer untersucht werden. Diese Studien können Aufschluß über die Topologie des Enzym-Komplexes geben, und damit ein weiteres Verständnis des Mechanismus der ATP-Synthese bzw. ATP-Hydrolyse vermitteln.

2. Material und Methoden:

2.1. Material

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A. von E. Merck AG, Darmstadt, falls nicht anders vermerkt. LDH, PK, NADH, PEP, ATP, Carboxypeptidase A, Trypsin und die Eichproteine: Cytochrom c (12500, MG), Chymotrypsinogen A (25000, MG), Albumin aus Hühnerei (45000, MG), Albumin aus Rinderserum (68000, MG), Aldolase (158000, MG), Katalase (240000, MG) und Ferritin (450000 MG) waren von Boehringer GmbH, Mannheim.

Acrylamid, Temed, Bisacrylamid, Harnstoff, Ammoniumperoxodisulfat, SDS, DTT, Xylene Cyanol FF, Bromphenolblau, Coomassie brillant blau 250R und Carrierampholyte (Servalyte) waren von der Firma Serva, Heidelberg; Agarose (Type 1) von Sigma Chemie GmbH, München und 2-Mercaptoäthanol von der Firma Schuchardt, München. Sämtliche verwendeten Lösungsmittel waren von der Firma J.T. Baker Chemicals, Deventer (Holland), DC-Fertigfolien A1700, Mikropolyamid von der Firma Schleicher und Schüll, 3354 Dassel und Mikroglaskapillaren waren von der Firma Brand, 6980 Wertheim.

In allen Versuchen wurde über Ionenaustauscher entionisiertes in einer Quarzapparatur destilliertes Wasser (bidestilliertes Wasser) verwendet.

Stammlösungen:

- Nr. (1) 48.75% (w/v) Acrylamid + 1.25% (w/v) Bisacrylamid in Wasser. (50%T, 2.5%C)
- (2) 2.5 M Tris-HCl Puffer (pH 8.3)
- (3) 1.5% (w/v) Temed
- (4) 0.1% (w/v) Bromphenolblau in Wasser
- (5) 0.3% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in Wasser
- (6) 10.0% (w/v) Acrylamid + 2.5% (w/v) Bisacrylamid in Wasser (12.5% T, 20%C)
- (7) 50% (w/v) Saccharose in Wasser
- (8) 10 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 8.0M Harnstoff, pH 8.3
- (9) 0.09M Tris-Borat, 7.5 M Harnstoff, pH 8.3
- (10) 2mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.2% 2-ME, pH 8.0
- (11) 0.25% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in Wasser
- (12) 3.3 M Tris- SO_4 pH 8.4
- (13) 47.5% (w/v) Acrylamid + 2.5% Bis-Acrylamid (50% T, 5%C)
- (14) 0.12% (v/v) Temed in Wasser
- (15) 0.39M Glycin, 0.13 M Tris-HCl, pH 8.4
- (16) 57.0% (w/v) Acrylamid, 3.0% (w/v) Bisacrylamid (60% T, 5% C)
- (17) 1.4% (v/v) Temed
- (18) 0.25% (w/v) Coomassieblau 250R, 45% Methanol, 45% Wasser, 10% Essigsäure.
- (19) 10 mM Tris-HCl. 2mM EDTA, 2 mM 2-ME, 1.0M LiCl, pH 8.0
- (20) 5% MeOH, 10% Hac in Wasser
- (21) 10 mM Tris-HCl, 10 mM ATP, 12 mM Mg-acetat pH 7.5

2.2. Methoden

2.2.1. Geräte:

Photometrische Messungen wurden mit dem Zeiss PMQ II Spektralphotometer oder einem Eppendorf Photometer (Netheler und Hinz, Gerätebau GmbH, Hamburg) mit Transformationsstufe 1853 und einem Kompensationsschreiber 4412 von Siemens ausgeführt. Die Temperaturkonstanz im Küvettenhalter wurde durch die Verbindung mit dem Ultra-Thermostaten NB 34039 der Firma Colora erreicht. Die pH-Messungen erfolgten mit dem pH-Meter 25, Radiometer, Copenhagen, mit einer Glaselektrode GK 2301 C. Die pH-stat Messungen wurden mit einem pH-stat Autotitratator, Autoburette, ABU 13, Radiometer, Copenhagen, ausgeführt. Zur Säulenchromatographie wurde der Ultrorac 7000 Fraktionssammler in Verbindung mit dem Uvicord II und Schreiber 6520-4 der Firma LKB Instruments GmbH, Düsseldorf, benutzt. Neben der analytischen Ultrazentrifuge von Beckmann, Typ Spinco Model E (AND-Rotor) wurden die Ultrazentrifuge von Beckmann, Typ L5-75 bzw. 50 (Ti-54 Rotor) und von ICE, Typ B60 (Sb 405 Rotor) Biotronik, Frankfurt, verwendet. Die Zentrifugationen unter $48.000 \times g$ wurden in einer Sorvall - Superspeed, Model RC-2B (SS 34, Rotor) bzw. in einer Eppendorf Zentrifuge 3200 durchgeführt.

Die präparativen Slab-gradienten Gele wurden in einem Gradienten-Mischer von der Firma Instrumentation Spec. Corp., Model 11570, Lincoln, Nebraska geformt.

Für die präparative PAGE und die Mini-Slab-Elektrophorese wurde eine Stromversorgungseinheit der Firma Müller, Hann.-Münden, für die Mikrodiscelektrophorese (MDE), Isoelektrische Fokussierung (IEF) eine der Firma E. Schütt, Göttingen und für die Discelektrophorese (DE), sowie für das Entfärben eine von Hewlett-Packard, Power Supply, 6209 B, DC verwendet. Die Discelektrophorese wurde in den Elek-

trophoresegeräten der Firmen Desaga (14 Röhrchen) und der Firma Shandon (Disc-Elektrophoresis, England) ausgeführt.

Die Densitometrie der MDE-Gele wurde an einem Doppelstrahl-Mikrodensitometer, Joyce Loebel, Gateshead-on-Tyne, Great Britain, durchgeführt. Die Discelektrophorese-Gele konnten durch ein Spektrodensitometer, Model SD 3000, Schoeffel Inst. Corp. aufgezeichnet werden. Die Fotografie der Mikrodiselektrophorese-Gele erfolgte mit einer Zeiss-Tessovar-Kamera und einem Bowens-Illumitran set.

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an einem HPLC-Gerät der Firma Waters Associates, Model 660 Solvent Programmer (mit zwei Pumpen, ein Perkin Elmer Spectrophotometer LC 55 und ein Siemens Kompensograph III) ausgeführt.

Die Absorptionsspektren wurden in einem Beckman-Gerät (UV 5230), die Fluoreszenzspektren in einem Hitachi-Perkin-Elmer Fluoreszenz-Spectrometer (Typ MPF-3) gemessen. Die CD-Spektren wurden von Herrn Dr. J. Watters an einem Dichrograph III von Jobin Yvon gemessen, der zur Signalverstärkung mit einem Nicolet 1074 "Signal Averager" gekoppelt war. Die Helizität wurde nach Chen et al. (19) berechnet.

Die Lichtstreuungsexperimente wurden von Herrn Dr. W. Doster mit einem He-Ne-Laser (Spectra Physics Mod. 125A, 50 mW) durchgeführt. Die Analyse der Intensitätsschwankungen wurde mit Hilfe des Malvern Systems 4300 vorgenommen. Für die Auswertung der erhaltenen Daten war das Spektrometer mit einem Interdata Computer 716 verbunden.

2.2.2. Präparation der mitochondrialen F_1 -ATPase

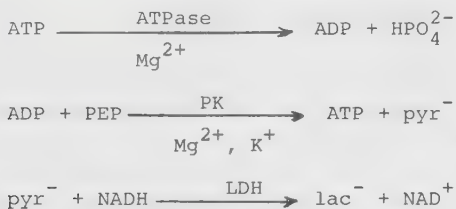
F_1 -ATPase wurde wie in (128) beschrieben präpariert. Isolierte submitochondriale Partikel (SMP) wurden mit Chlo-roform behandelt. Die in der wässrigen Phase gelöste F_1 -

ATPase wurde durch Chromatographie an DEAE-Zellulose und nachfolgender Ultrogel AcA34 gereinigt. Das isolierte Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 200-400 U/mg (bei 25°C) ist bei der analytischen Ultrazentrifugation, der Gelfiltration und der Laserlichtstreuung homogen. Als Lagerform des Enzyms diente eine Suspension in 70% Ammoniumsulfat (0.25 M Saccharose, 4 mM ATP, 2 mM EDTA und 50 mM Tris-SO₄, pH 8.0).

2.2.3. ATPase-Aktivitätsmessungen

2.2.3.1. Gekoppelter Enzymtest

Die enzymatische Aktivität der ATPase wurde, wie von Pullman et al. (129) beschrieben und von Ebel und Lardy (130) modifiziert gemessen unter Benutzung folgender Reaktionen:



Der Testansatz von 1.0 ml Gesamtvolumen setzte sich wie folgt zusammen: 50 mM Tris-KOH, 2 mM MgCl₂, 2 mM PEP-K⁺, 0.3 mM NADH, 1 mM KCN, 0.05 mg PK, 0.025 mg LDH und 2 mM MgATP, pH 8.0. Die Enzymaktivität wurde aus der Abnahme der NADH-Absorption mit der Zeit berechnet.

2.2.3.2. pH-stat-Messung

Die durch die ATPase-Aktivität freigesetzten H⁺-Ionen wurden laufend mit dem pH-staten mit automatischer Alkalizugabe (0.02 M NaOH) titriert. Dabei ist die Geschwindigkeit der Alkalizugabe der ATPase-Aktivität proportional. Folgender Testansatz wurde bei einer Inkuba-

tionstemperatur von 25°C verwendet: 10 mM Tris-SO₄, 10 mM ATP, 12 mM Mgac₂, pH 7.5. Das Reaktionsvolumen war 2.02 ml und die Auswertung der Messungen erfolgte über ein Programm der IBM-Rechenanlage, wobei die jeweiligen Änderungen des Volumens pro Min. berücksichtigt wurden. Aktivitätseinheiten werden in $\mu\text{Mol ATP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ angegeben.

2.2.4. Proteinbestimmungen

Die Proteine wurden gemäß der Methode nach Lowry et al. (131) nach der Biurett-Methode (132) bzw. nach der Coomassie-Methode (133) bestimmt, wobei Rinderserum-Albumin (BSA) als Standardprotein verwendet wurde.

2.2.5. Präparation der Untereinheiten

2.2.5.1. LiCl-Fällung

10 mg F₁ (Suspension in 70% Ammoniumsulfat) wurden zentrifugiert (230000 x g, 2°, 1h), der proteinfreie Ammoniumsulfat-Überstand verworfen und der weiße F₁-Niederschlag in 1.4 ml Puffer 19 gelöst. Nach 2h Inkubation mit 1 M LiCl bei Raumtemperatur wurde die milchig-weiße Suspension abzentrifugiert (230000 x g, 18°, 1h) und der "β-reiche" Überstand abpipettiert.

Der Niederschlag (α-Fraktion) wurde in 0.1 ml Puffer 8 suspendiert und nach Zugabe von 0.02 ml 2-Mercaptoäthanol 30 Min bei 100°C belassen. Nach vollständiger Lösung der rohen α-Untereinheit wurde die Lösung auf 4°C abgekühlt und 0.2 ml 50% Saccharose-Lösung 7 und 0.05 ml Bromphenolblau-Lösung 4 hinzugefügt. Die rohe α-Fraktion wurde für die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) vorbereitet. Der "α-reiche" Überstand wurde nach weiteren 8 Stunden im gleichen Medium weiter verarbeitet.

2.2.5.2. Herstellung von Slab-Gradienten-Gelen.

Gradientengele (12.5 - 28% T) für die präparative Elektrophorese wurden in die mit 0.2% Agarose abgedichteten Glaskammern (14.5 x 16.0 x 0.6 cm) mit Hilfe eines Gradientenmischers eingefüllt. Das Volumen betrug 38 ml und der Fluß 8.0 ml/Min bei 4°C. Die fertigen Gradientengele polymerisierten bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Min. Anschließend wurde eine Konzentrierungszone - das sogenannte Obergel - aufgegeben und in dieses ein "Spacer" für die spätere Probenaufgabe eingesetzt.

Gellösungen für zwei Slabgele:

Lösung I:	Lösung II:	Obergel:
45 ml Lösung 1	20 ml Lösung 1	6 ml Lösung 2
4 ml Lösung 2	5 ml Lösung 2	6 ml Lösung 3
3 ml Lösung 3	8 ml Lösung 3	6 ml Lösung 5
4 ml Lösung 4	5 ml Lösung 5	12 ml Lösung 6
4 ml Lösung 5	20 ml Lösung 8	12 ml Lösung 7
20 ml Lösung 8	22 ml Wasser	6 ml Lösung 8

Die Slabgele wurden vor Gebrauch bei 160 V und 4°C, 8h äquilibriert.

2.2.5.3. Präparative - Slab - Gradienten PAGE.

Die in Puffer 9 aufgenommene rohe α -Probe (ca. 18-20 mg α /ml) wurde mit 0.1 ml Lösung 4 und 0.3 ml Lösung 7 versetzt und auf die PAGE aufgegeben, wobei die vorbereitete Probe in 7.5 M Harnstoff-Tris-borat-Puffer unterschichtet wurde. Zu Beginn der Elektrophorese wurden 10 Volt/cm Gellänge 15 Min und anschließend 15 Volt/cm Gellänge 8h angelegt.

2.2.5.4. Nachweis und Extraktion

Nach erfolgter Elektrophorese wurden zwei Seitenstreifen (1.0 und 1.5 cm Breite) vom Slabgel mit einem Skalpell abgeschnitten, 1.5h bei Raumtemperatur mit Coomassie brillant blau 250 R Lösung 18 gefärbt und elektrophoretisch 6h in MeOH/HAc/ H₂O (45/10/45/ v/v/v) entfärbt. Durch Anpassen der gefärbten Seitenstreifen wurden die unbehandelten Proteinbanden ausgeschnitten und homogenisiert. Das homogenisierte Gel wurde in 50 ml Puffer 10 suspendiert und anschließend 6h bei Raumtemperatur gerührt. Die Gelsuspension wurde danach abzentrifugiert (48.000 x g, 2°C, 30 Min) und der Überstand über Glaswatte bei 4°C filtriert. Der Niederschlag wurde noch zweimal unter denselben Bedingungen extrahiert. Die Filtrate aus Extraktion I und II wurden mittels Amicon-Ultrafiltration (PM 30 Membranfilter) konzentriert. Das Filtrat wurde wie das Konzentrat lyophilisiert, in der SDS-Microdiscelektrophorese (MDE) bei gleichzeitiger Proteinbestimmung überprüft.

2.2.6. Mikro-Disc-Elektrophorese (MDE).

Die MDE wurde wie in (134) beschrieben mit geringfügigen Änderungen angewandt, wobei die Zusammensetzung der Gradientengele (in 10 µl Glaskapillaren) dem Problem entsprechend variiert wurde (5-7).

Zusammensetzung der Gellösungen:

Gellösung I	Gellösung II
2 Teile Lösung 11	1 Teile Lösung 12
1 Teile Lösung 12	8 Teile Lösung 13
7 Teile Wasser	1 Teile Lösung 14

Für die nicht-denaturierende Mikroelektrophorese wurde der Tris-Glycin Puffer 15, für die denaturierende SDS-Mikrodiscelektrophorese wurde dem Puffer SDS (0.1% w/v)

zugesezt. Die Mikrodiselektrophorese wurde bei 70-100 V/cm Gellänge innerhalb von 25 Min. Laufzeit durchgeführt. Bromphenolblau (Lösung 4) eignete sich als Indikator für den anodischen Lauf. Das Färben der Gele erfolgte in Coomassie brillant blau 250 R Lösung (0.1% in 10% HAC, 15% MeOH) in 5 Min bei Normalgelen und in 20 Min bei SDS-Mikrogelen. Nach dem Entfärben (ca. 10 Min.) in 10% HAC - 15% MeOH-Mischung wurden die Mikrogradientengele mit Wasser, dann mit absolutem MeOH und in 10% HAC zur Lagerung gegeben. Die entwickelten Mikrodiselektrophorese-Gele wurden fotografiert und ihre Densitogramme aufgenommen.

2.2.7. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die analytische IEF wurde mit derselben apparativen Ausrüstung wie die Mikrodiselektrophorese durchgeführt (135,136), wobei folgende Gelmischung bei 4°C vorbereitet wurde.

- 1.5 Teile Lösung 11
- 1.0 Teile Lösung 16
- 0.5 Teile Lösung 17
- 1.0 Teile Carrier Ampholyte (CA)
- 1.0 Teile Glycerin
- 5.0 Teile Wasser.

Die Glaskapillaren wurden mit der Gellösung bis zu 4/5 des Gesamtvolumens gefüllt und zur Polymerisation bereitgestellt. Nach erfolgter Polymerisation wurden die Gele 5h bei 4°C gelagert. Die in 30% Saccharose, 0.1% (w/v) Xylencyanol und 2% Carrier Ampholyt gelöste Probe wurde auf die Saccharoselösung 7 aufgegeben und mit 10% Saccharose Lösung überschichtet. Die IEF in Mikrokapillaren erfolgte bei 70-120 V/cm Gellänge innerhalb von 45 Min. Bei der anodischen Isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurde das Kathoden-Reservoir mit 0.5N NaOH und das Anoden-Reservoir mit 0.5 N H₂SO₄ gefüllt. Danach wurde das Gel mittels Stahldraht aus der Kapillare entfernt und 15 Min. bei Raumtemperatur mit 10% Trichloressigsäure (TCA) -

33% Äthanol-Mischung behandelt (8,10). Die Färbung erfolgte innerhalb von 5 Min., (0.1% Coomassie brillant blau 250 R in 7% HAC, 20% Äthanol), die Entfärbung nach 15 Min. in derselben Mischung ohne Coomassie brillant blau 250 R. Die Densitometrie und Fotografie wurden sofort nach dem Entfärben und Waschen der Gele durchgeführt.

2.2.8. Mini-Slab-Gradienten PAGE

Die Mini-Slab-Geltechnik wurde wie in (137) beschrieben ausgeführt. Die Ausmaße der Gelkammer waren 6 x 8.5 x 0.2 cm. In den meisten Fällen wurde ein Gelgradient von 3 -30% T angewandt (138). Folgende Gellösungen wurden für die anodische Elektrophorese verwendet:

Lösung I	Lösung II
6.0 Teile Lösung 1	0.6 Teile Lösung 1
0.5 Teile Lösung 2	0.5 Teile Lösung 2
0.5 Teile Lösung 3	1.0 Teile Lösung 3
0.5 Teile Lösung 4	1.0 Teile Lösung 5
0.5 Teile Lösung 5	6.9 Teile Wasser
2.0 Teile Wasser	

Die anodische Mini-Slab-Gradienten PAGE wurde bei 40 Volt/cm Gellänge, 4°C und einer Dauer von 4h durchgeführt.

2.2.9. Disc-Elektrophorese (DE)

Zur Molekulargewichtsbestimmung sowie für die Durchführung von Dissoziationsstudien wurden Disc-Elektrophoresen (DE) in Glasröhrchen (9.5 x 0.45cm) durchgeführt. Die Methode wurde wie in (139) beschrieben in 10% Acrylamid-Gelen und 0.1% (w/v) SDS angewandt. Nach einer Elektrophoresedauer von 4h bei Raumtemperatur (8 mA pro Gelröhrchen) wurden die Gele in Coomassie brillant blau (Lösung 18) gefärbt und in HAC-MeOH-Mischung-20 entfärbt. Die Densitometrie und Photographie erfolgten wie angegeben.

2.2.10. Endgruppenanalysen

Die N-terminalen Aminosäuren der isolierten Proteine wurden nach der Methode von Chang et al. (140) mit dem DABITC-Reagenz markiert und mikro-dünnschicht-chromatographisch auf Polyamid-Folien (3x3 cm) identifiziert. Parallel dazu wurden die N-terminalen Aminosäuren als 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH)-Aminosäuren nach Edman (141) am HPLC-Gerät untersucht. Die Dansylierung erfolgte nach der Methode von W.R. Gray (142) und der Nachweis mittels Mikrodünnschichtchromatographie auf Polyamid-Folien (3 x 3 cm) im UV (143).

Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren wurde die Carboxypeptidase A-Spaltung durchgeführt (144). Die käufliche Carboxypeptidase A Suspension des Enzyms wurde abzentrifugiert, der Niederschlag mit Wasser gewaschen und in 1% Natrium-hydrogencarbonatlösung pH 8.2 aufgenommen. Die isolierten Untereinheiten wurden mit 20% Trichloressigsäure (TCA) bei Raumtemperatur (Endkonzentration ca. 5%) gefällt, nach 30 Min. bei 4°C Inkubation abzentrifugiert und mit 0.2 M N-Äthylmorpholinacetat pH 8.2 aufgenommen. Die Spaltung wurde durch Hinzufügen der Carboxypeptidase-Lösung eingeleitet. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden der Reaktionsmischung äquivalente Proben entnommen und das Protein mit TCA gefällt. Der freie Aminosäuren enthaltende Überstand wurde nach Lyophilisation in 0.2 M LiCl-Citrat-Puffer gelöst und auf den Aminosäure-Analysator aufgegeben.

Die Aminosäureanalysen wurden mit einem automatischen Aminosäure-Analysator (Firma Biotronik) ausgeführt, wobei eine Modifikation der Methode nach Moore (145) benutzt wurde. Zur Bausteinanalyse von Proteinen wurde eine Totalhydrolyse von 24,48 und 72h bei 110°C mit 6 N HCl vorgenommen. Die mit 20% TCA gefällten Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen (2-Mercaptoäthanol, 1:2000v/v) hydrolysiert. Cystein wurde mit Perameisensäure zur Cysteinsäure oxidiert. Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Proben mit dem Aminosäure-Analysator analysiert.

3. Resultate

Wenn man die Funktion der Untereinheiten der mitochondrialen F_1 -ATPase innerhalb des nativen Komplexes aufklären will, muß man ihre Struktur und schließlich ihre strukturelle Anordnung im Komplex kennen. Ziel dieser Untersuchungen war es daher zunächst, Verfahren auszuarbeiten, die es erlauben, einzelne Untereinheiten des Komplexes zu isolieren. Dazu war es notwendig, herauszufinden, in welche Komponenten der Gesamtkomplex zerfällt und unter welchen Bedingungen einzelne Untereinheiten isoliert abdissoziieren und damit eine Isolierung der Untereinheiten zu ermöglichen.

Zunächst hatten wir erkannt, daß eine vollständige Dissoziation der F_1 -ATPase in seine Untereinheiten durch Agenzien, wie z.B. Lithiumchlorid, Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff zu undefinierten Assoziaten der Untereinheiten führt und daß sich damit die einzelnen Komponenten durch Säulenchromatographie bzw. Elektrophorese nicht reindarstellen lassen. Daher wurde die partielle Dissoziation der F_1 -ATPase in seine Untereinheiten unter verschiedenen Bedingungen genauer untersucht, und schließlich gefunden, daß Kälte (96, 98) bzw. LiCl (unter Bedingungen wie sie schon von Slater et al. (146) beschrieben wurden) zur Abspaltung einer Untereinheit führten. Im folgenden werden diese Versuche beschrieben, die es zum einen ermöglichten, die α - und β -Untereinheit zu isolieren und charakterisieren und zum anderen durch Dissoziations- und Renaturierungsexperimente einen gewissen Aufschluß über die Topologie des F_1 -Moleküls zu geben.

3.1. Homogenität und Zusammensetzung der F_1 -ATPase

Die Homogenität der isolierten mitochondrialen F_1 -ATPase wurde zunächst überprüft. Es zeigte sich, daß die zum Versuch gelangte F_1 -ATPase etwa 3% Nebenbanden aufwies (Abb. 2). Als typisches Beispiel ist in

der Abb. 2 das Disc-Elektrophoresegel wiedergegeben, wobei die Trennung der nicht-denaturierenden bzw. nicht-dissoziierenden Bedingungen durchgeführt wurde. Die Natur der Nebenbanden ist unklar. Es könnte sich hierbei um kleine Mengen von abdissoziierten und vielleicht aggregierten Untereinheiten handeln. Diese Frage würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.



Abb. 2:

Disc-Elektrophorese-Gel der F_1 -ATPase unter nicht-denaturierenden Bedingungen. 25 μ g F_1 -Protein, Lauf bei Raumtemperatur, 8 mA/Gel, Phosphat-Puffer.

Für Dissoziationsstudien, die auf die Charakterisierung der einzelnen Untereinheiten hinauslaufen, war es notwendig, mitgeschleppte Proteasen zu identifizieren. Tatsächlich fanden wir beträchtliche Aktivitäten, wie man z.B. an einer Präparation von hochgereinigter F_1 -ATPase sehen kann, die mit SDS (0.1% w/v) längere Zeit inkubiert wurde. Es ergibt sich in der Discelektrophorese ein kom-

plexes Bandenmuster (Abb. 3) mit vor allen Dingen niedermolekulareren Proteinen. Diese Aktivität wird insbesondere in Gegenwart von GuHCl und SDS gefunden. Es ist wahrscheinlich, daß durch diese Agenzien empfindliche Stellen am F_1 -Molekül frei und damit proteolytisch spaltbar werden.

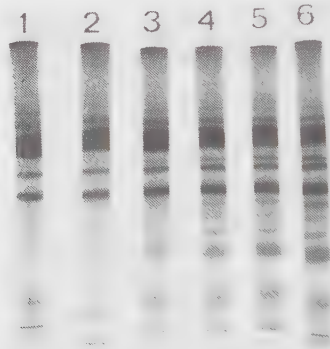


Abb. 3: SDS-Disc-Elektrophorese-Gele (Nr. 1-6) nach Inkubation in SDS-Phosphatpuffer, 20 mM, NaH_2PO_4 , pH 7.5, Proteinkonzentration 1.0 mg F_1 /ml und Inkubationszeiten: 1.) 0.5 h, 2.) 1.0 h, 3.) 3.0 h, 4.) 5.0 h, 5.) 7.0 h und 6.) 12.0 h.

Durch Zusatz von 2-Mercaptoäthanol, EDTA oder Harnstoff kann die Proteasenaktivität fast vollständig unterdrückt werden (Abb. 4). Aus diesen Gründen wurden alle weiteren Experimente in Gegenwart von 2-Mercaptoäthanol und EDTA vorgenommen.

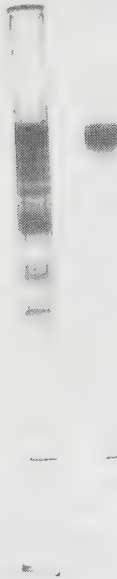


Abb. 4: SDS-Disc-Elektrophorese-Gele, Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) in Abwesenheit von Harnstoff (links) und in 6.0 M Harnstoff (rechts).

Die Untereinheiten-Zusammensetzung wurde an der gereinigten F_1 -ATPase mittels SDS-Mikro-Discelektrophorese untersucht. Wie Abb. 5 zeigt, gibt es zusätzlich zu den fünf F_1 -Nebenbanden bei 64000 und bei 43000 kleine Nebenbanden. Der Ursprung dieser Anteile ist nicht bekannt.

Im Bereich der kleinen Untereinheiten (δ, ϵ) bestehen Unklarheiten. In einigen Analysen wurde eine δ -Doppelbande gefunden, die ebenfalls in der präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbar wurde.

F₁ 73 (SDS, DTT)
10_x, D 836 d, green

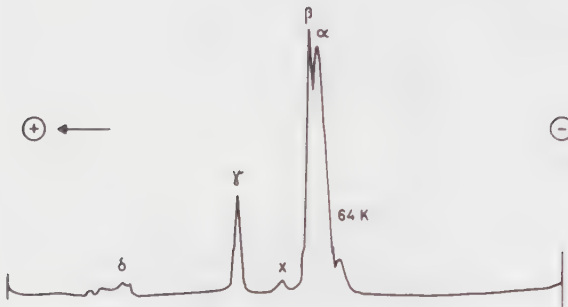


Abb. 5: SDS-Mikrodisc-Elektrophorese Densitogramm der gereinigten F₁-ATPase.

Für die einzelnen Untereinheiten konnten aufgrund der SDS-Microdisc-Elektrophorese (Planimetrie) folgende prozentuale Anteile berechnet werden (Tabelle 1).

Proteinbande	MG	Gewichts %
α	58.800	44
β	55.000	44
γ	34.000	7
δ	10.000	2
ε	8.600	1
X	43.000	1
64K	64.000	1

Tabelle 1: Prozentuale Zusammensetzung der F₁-ATPase.

Alle neuen Enzympräparationen wurden wie oben beschriebenen charakterisiert und in weiteren Versuchen eingesetzt.

3.2. Dissoziationsexperimente

3.2.1. Chemische Dissoziation der F_1 -ATPase

F_1 -ATPase wurde mit jeweils 0.1 M GuHCl, LiCl, bzw. Harnstoff behandelt, wobei eine Komponente (X) vom F_1 -Molekül abdissoziierte (Abb. 6). Die Versuche wurden in Gegenwart von EDTA (pH 8.0) bei Raumtemperatur ausgeführt. Parallel zur Zunahme der Komponente X nahm die F_1 -ATPase-Bande mit fortschreitender Inkubationszeit ab. Gleichzeitig mit dem Anstieg von X entsteht eine Komponente (hier mit F_1' bezeichnet), deren Molekulargewicht nur wenig kleiner ist als das vom nativen F_1 .

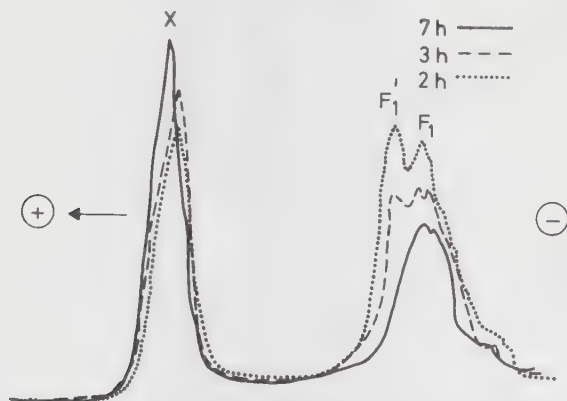


Abb. 6: Densitogramme der Disc-Elektrophorese in 0.1 M GuHCl nach 2.0, 3.0 und 7.0 h Inkubation bei Raumtemperatur, Proteinkonzentration 7.0 mg F_1 /ml Puffer.

Dieses Dissoziationsverfahren ließ sich zur Isolierung der α - und β -Untereinheiten ausbauen, wobei LiCl als Reagenz genommen wird. Bei der Behandlung von F_1 mit LiCl wird ebenfalls die Komponente X abgespalten, die während der Versuchsdauer präzipitierte. Durch Zentrifugation kann sie leicht abgetrennt werden. Die Untersuchungen des Niederschlags in der SDS-Disc-Elektrophorese

(Abb. 7) zeigt neben Spuren von anderen Bestandteilen nur noch eine Bande, die mit dem gleichen R_M -Wert wandert wie die α -Untereinheit der F_1 -ATPase, deren Identität weiter unten beschrieben wird. Der Überstand bestand in der Hauptsache aus der β -Untereinheit, sowie aus der γ - und Spuren der α -Untereinheit (Abb. 8). Bei höheren Konzentrationen an Dissoziationsmitteln kommt es zusätzlich zur Aggregation von abdissoziierten Untereinheiten, die jedoch im Densitogramm der Abb. 6 nicht zur Darstellung kommen. Durch Gelfiltration konnte schließ-

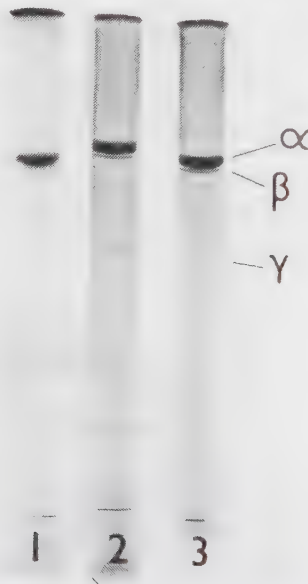


Abb. 7: SDS-Disc-Elektrophorese-Gele des α -Niederschlags nach 1 M LiCl-Inkubation von F_1 -ATPase bei Raumtemperatur. Inkubationszeiten der Gele 1-3: 4, 7 und 10 h. Probenaufgabe 0.005 ml. Probenkonzentration: 6 mg E_0 /ml LiCl-Inkubationspuffer. Inkubationspuffer: 1.0 M LiCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 8.0.

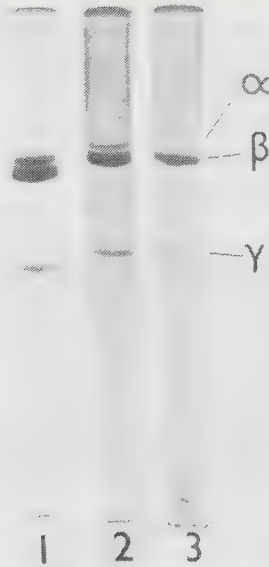


Abb. 8: SDS-Disc-Elektrophorese des β -reichen Überstandes nach LiCl-Inkubation von F_1 -ATPase bei Raumtemperatur, Bedingungen wie Abb. 7.

lich die abdissoziierte Komponente X vom restlichen F_1 -Molekül (F_1') abgetrennt werden. In den Elutionsprofilen (Abb. 9) sieht man das Auftreten der F_1 und F_1' Banden nach 30 und 80 Minuten.

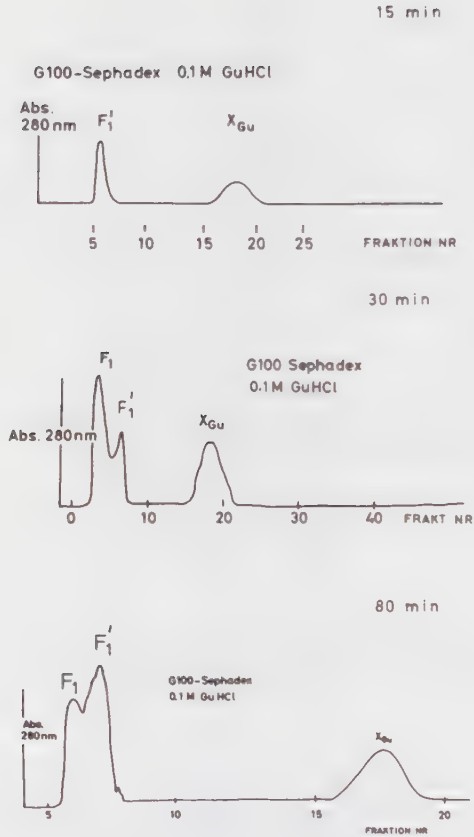


Abb. 9: Gelfiltrationsprofile von F₁-ATPase nach 15, 30 und 80 Min., 0.1 M GuHCl Inkubation. Protein-Konzentration: 7.0 mg F₁/ml Puffer bei Raumtemperatur. Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.1 M GuHCl, pH 8.0) Sephadex G-100 fine, Säule 50 x 0.9 cm, Fluß 15 ml/h.

Zur weiteren Charakterisierung der Dissoziationsprodukte wurden Ultrazentrifugations-Experimente durchgeführt. Abb. 10 zeigt die Komponente X als langsam sedimentierende Fraktion ($S_{20,w}^0$ 2.7 - 2.9), während die schweren Komponenten F_1' und F_1 -ATPase mit einer Sedimentationskonstante von 10.8 - 10.9 $S_{20,w}^0$ zusammenfallen.

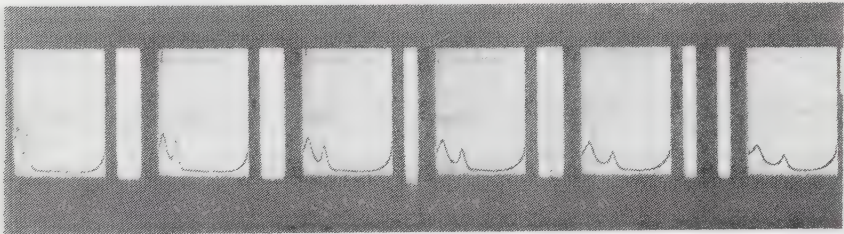


Abb. 10: Ultrazentrifugationslauf. Sedimentationsrichtung von links nach rechts, 60 000 upm, 20°C, Phasenwinkel 65°, Proteinkonzentration 8.06 mg F_1 /ml Puffer (0.4 M GuHCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0), Inkubationszeit 2.5 h bei Raumtemperatur, Komponente X - Peak links, F_1 bzw. F_1' - Peak rechts.

3.2.2. Kälteelabilität

Es ist bekannt, daß die F_1 -ATPase in der Kälte relativ labil ist. So beträgt die Halbwertszeit der Inaktivierung bei 4°C 50 Minuten (siehe Seite 46). Es lag nahe nachzuprüfen, ob diese Kälteelabilität ebenfalls mit der präferentiellen Abspaltung der Komponente X zusammenhängt. In der Tat konnte nach der Kältebehandlung durch Elektrophorese, Gelfiltration und Ultrazentrifugation gezeigt werden, daß bei einer Proteinkonzentration von 7.0 mg F_1 /ml nach 10 Minuten (4°C) die Komponente X abdissoziierte (Abb. 11).



Abb. 11: Disc-Elektrophorese-Gele nach Kälteinkubation von F_1 -ATPase bei 4°C , Inkubationszeit (Gele Nr. 1-4): 10, 20, 30 und 60 Min. Proteinkonzentration 7.0 mg F_1 /ml Inkubationspuffer.

Die Abbildung zeigt von oben nach unten zunächst die breite F_1 -Bande gefolgt von der schmalen F_1' -Komponente. Weiter findet man eine verwaschene Bande, deren Identität unbekannt ist und schließlich am Ende des ersten Drittels des Gels ist die Bande X. Auch hier konnte gezeigt werden, daß X mit α identisch ist (siehe unten). Die Konzentration der Bande X nimmt im Laufe der Zeit zu (Abb. 11, Gel 1 - 4). Im weiteren Verlauf der Einwirkung beobachtet man das Auftreten weiterer Dissoziationsprodukte. Der Prozess kann in zwei Phasen aufgeteilt werden. Zunächst dissoziiert vom F_1 -Molekül die Komponente X. In der zweiten Phase zerfällt das Restmolekül (F_1') in seine

weiteren Komponenten bei gleichzeitiger Aggregation einzelner Untereinheiten. Bei der großen Komplexität dieses Prozesses wurde von einer weiteren Untersuchung zunächst abgesehen.

Untersuchungen mit Hilfe der Ultrazentrifuge ergaben Sedimentationswerte von $10.6 S_{20,w}^O$ für F_1' und $2.6 S_{20,w}^O$ für X. Demgegenüber betrug im Kontrollexperiment der Wert für native F_1 -ATPase $12.6 S_{20,w}^O$.

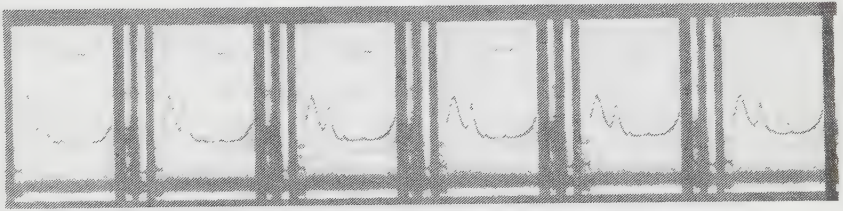


Abb. 12: Ultrazentrifugationslauf. Sedimentationsrichtung von links nach rechts, 60.000 upm, 5.7°C, Phasenwinkel 65°, Proteinkonzentration 8.27 mg F_1 /ml Puffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0), Inkubationszeit 3.0 h bei 4°C.

3.3. Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten

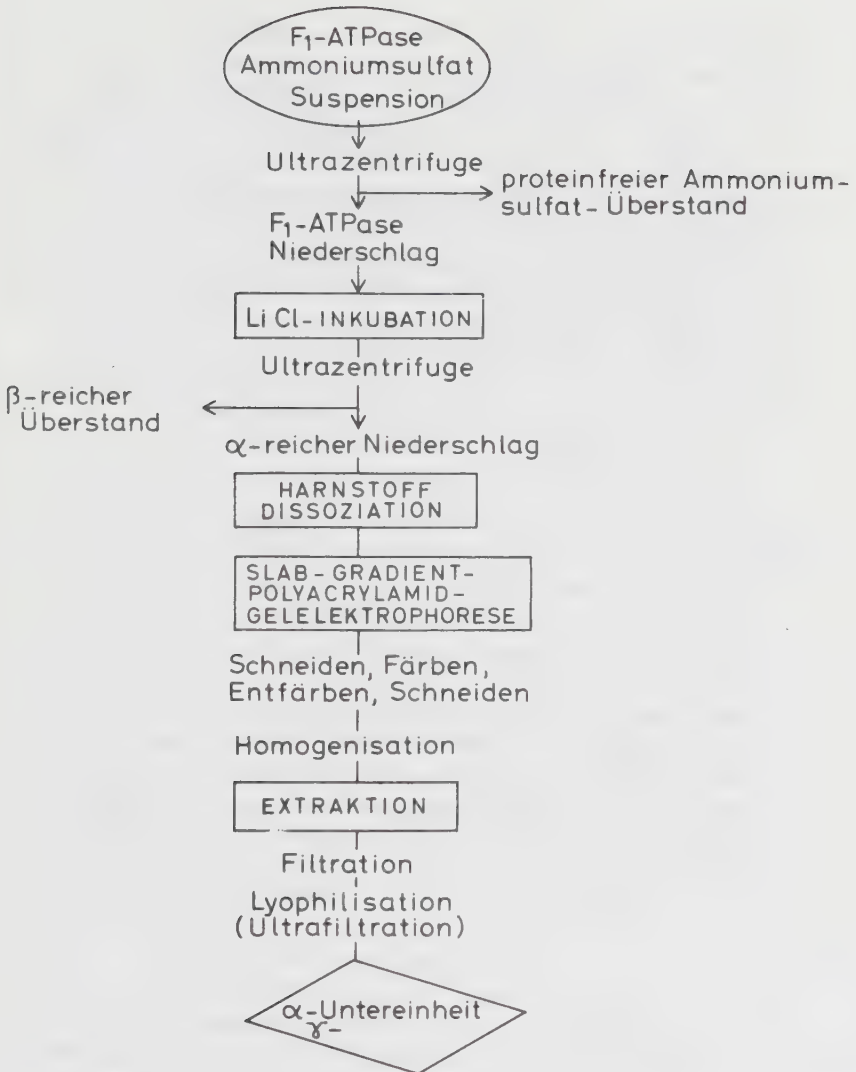
3.3.1. Isolierung der α - und γ -Untereinheiten

Die an der mitochondrialen F_1 -ATPase ausgeführten Dissoziationsstudien zeigten, daß eine Dissoziation des F_1 -Moleküls durch LiCl-Inkubation und nachfolgender elektrophoretischer Trennung der Untereinheiten möglich ist. Es konnte eine Präparation der α -Untereinheit (bei der auch die γ -Untereinheit anfiel) ausgearbeitet werden, die sich in vier Abschnitte gliedern läßt (Fließschema 1):

- 1) LiCl-Fällung
- 2) Harnstoff-Dissoziation
- 3) Elektrophoretische Trennung der Untereinheiten
- 4) Extraktion der Proteine.

1) LiCl-Fällung

Die Reinheit und die Menge der von der mitochondrialen F_1 -ATPase durch die LiCl-Inkubation abdissoziierten α -Untereinheit wurde durch elektrophoretische Verfahren, wie z.B. durch Disc- und Mikrodisc-Elektrophorese studiert und optimiert. Die Optimierung der LiCl-Inkubation war notwendig, denn es sollte eine möglichst quantitative Abspaltung der α -Untereinheit vom oligomeren Enzym erreicht werden, ohne daß gleichzeitig schon andere Untereinheiten mit abgespaltet werden. Folgende Parameter wurden deshalb variiert: Zusammensetzung des Inkubationspuffers, Konzentration von LiCl und F_1 -Protein, Temperatur und Inkubationszeit. Bei den Anfangsexperimenten wurde von Hinweisen bezüglich der LiCl- und F_1 -Konzentration aus der Literatur ausgegangen (17, 20) und in den folgenden Optimierungsexperimenten konstant gehalten. Als günstigstes Medium für die LiCl-Fällung erwies sich ein Tris-HCl Puffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 8.0). Die LiCl-Inkubation bei verschiedenen Temperaturen zeigte, daß sich bei tieferen



Fließschema 1: Präparationsschema der α - bzw. γ -Untereinheit

Temperaturen ($0 - 10^{\circ}\text{C}$) undefinierte Aggregate bildeten. Bei Zimmertemperatur dagegen trat schon nach einer Stunde ein weißer Niederschlag auf, bei dem es sich um relativ reines α handelte. Bei längerer Inkubationszeit konnten neben α und γ auch Spuren von β nachgewiesen werden. Daraus ergab sich folgendes zeitliches Schema für die Isolierung der rohen α -Untereinheit: Nach 2.0 h LiCl-Inkubation wurde eine rohe α -Untereinheitenfraktion gewonnen und nach weiteren 8.0 h Inkubation erhielt man die restliche α -Untereinheit zusammen mit der γ -Untereinheit. Die abdissoziierte α -Untereinheit aggregierte in kürzester Zeit zu einer durchsichtigen, festen Masse.

2) Harnstoff-Dissoziation

Nach der groben Trennung der beiden großen F_1 -Untereinheiten (α, β) durch LiCl-Fällung und Zentrifugation ließ sich die noch verunreinigte α -Untereinheit nur durch höhere Konzentration von Dissoziationsmitteln in Lösung bringen. SDS bzw. GuHCl lösten zwar die Aggregate, konnten aber später nicht vollständig vom isolierten Protein entfernt werden. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Versuchen Harnstoff verwendet. Der α_n -Niederschlag wurde bei einer Proteinkonzentration von ca. 19 mg/ml Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.3) in Gegenwart von 8 M Harnstoff 30 Minuten bei 100°C erhitzt und gelöst.

3. Elektrophoretische Trennung der Untereinheiten

Für die weitere Reinigung der α -Untereinheit wurde die präparative Slab-Gradienten-Polyacrylamidgelelektrophorese in 7.5 M Harnstoff ausgenutzt. Das Gradientengel hat gegenüber dem kontinuierlichen Gel den Vorteil der größeren Schärfe der Proteinbanden. Der Gelgradient (12.5 - 28.0 % T, 5 % C) wurde so gewählt, daß der Abstand zwischen den Untereinheiten maximal war und der Gelabschluß so hoch vernetzt war, daß die kleinsten Untereinheiten (δ, ϵ) nicht aus dem Gel herauswandern konnten. Die Trennkapazität der präparativen Elektrophorese war 2.0-5.0 mg Protein. Die elektrophoretische Trennung der Untereinheiten (α, γ) erfolgte bei 190-250 V bei 4°C innerhalb von 8 h (Abb. 13).

4) Extraktion der Proteine

Nach erfolgter Elektrophorese mußte das Protein mit hoher Ausbeute aus dem Gel extrahiert werden. Die Lokalisierung der separierten Proteinbanden wurde durch Abschneiden und Entwickeln (Färben/Entfärben) von zwei Gelstreifen durchgeführt. Da die entwickelten Gelstreifen sich nach Behandlung mit absolutem Methanol kontrahierten und mit 10 % Essigsäure ausdehnten, konnten diese genau an das unbehandelte Gel angepaßt werden. Die ausgeschnittenen Proteinbanden (α - und γ -Banden) wurden homogenisiert und in 50 ml Pufferlösung (2 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 8.0) suspendiert. Die Gelsuspension wurde bei Raumtemperatur 6 h gerührt, anschließend abzentrifugiert und der Überstand mittels

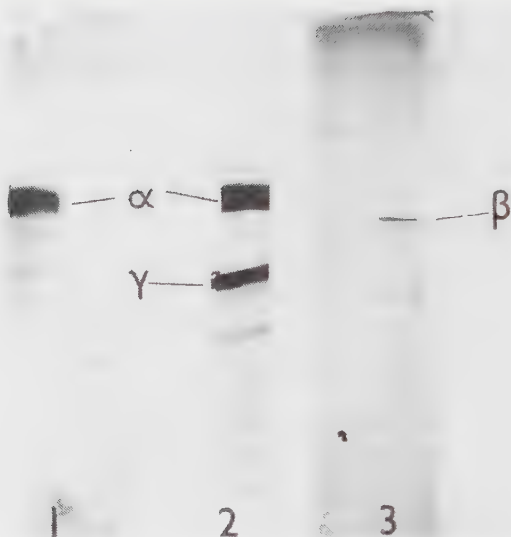


Abb. 13: Gelstreifen von den präparativen Slab-Gradienten-Polyacrylamidgelen zur Präparation der α , β und γ -Untereinheiten.

Ultrafiltration und Lyophilisation konzentriert.

Die Gele wurden dreimal extrahiert. Durch Proteinbestimmungen von der eingesetzten F_1 -ATPase, des gelösten α_n -Niederschlags- und der konzentrierten α -Untereinheit wurde eine Ausbeute von ca. 20% (bezogen auf F_1 -ATPase) für die α -Untereinheit und ca. 12% für die γ -Untereinheit berechnet.

Die nach diesem Verfahren gewonnenen α - und γ -Untereinheiten waren nach den Kriterien der SDS-Elektrophorese, der Isoelektrischen Fokussierung, der Ultrazentrifugation und Laserlichtstreuung, sowie der Endgruppenbestimmungen (siehe Seite 35) rein.

3.3.2. Isolierung der β -Untereinheit

Die Isolierung der zweiten großen Untereinheit der F_1 -ATPase wurde durch Erweiterung des α -Präparationsschemas ausgeführt (Abb. 14). Der β -reiche Überstand der LiCl-Fällung wurde 10 h (gegen 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5% 2-Mercaptoäthanol, pH 7.5) bei 4°C dialysiert, wobei die β -Untereinheit präzipitierte. Durch Zentrifugation (230.000 x g, 1 h, 2°C) trennte man den Niederschlag von den kleinen löslichen Untereinheiten (δ, ϵ). Dieser wurde in Puffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1% 2-Mercaptoäthanol, pH 8.3) in Anwesenheit von 8 M Harnstoff gelöst und ebenfalls wie die α -Untereinheit elektrophoretisch getrennt (Abb. 13). Die isolierte β -Untereinheit Ausbeute: ca. 20 % bezogen auf F_1 -ATPase war rein nach den Kriterien der elektrophoretischen Verfahren, der Isoelektrischen Fokussierung, der Ultrazentrifugation und der Laserlichtstreuung, sowie den Endgruppenbestimmungen (siehe unten).

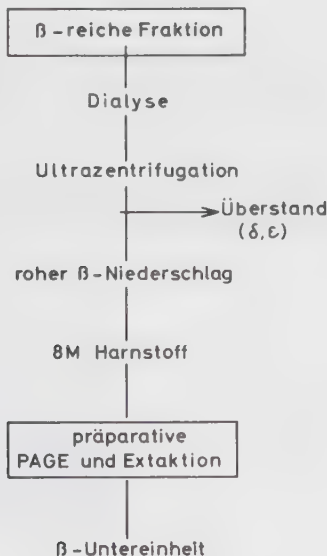


Abb. 14: Präparationsschema für die β -Untereinheit

3.3.3. Charakterisierung der Untereinheiten α , β und γ .

Im Verlauf der Untersuchungen wurde gesichert, daß es sich bei der Komponente X um die α -Untereinheit handelt, deren Isolierung im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde. Die Identität beider Substanzen wird am Schluß des Kapitels dargestellt. Im folgenden wird die Identität als gesichert angenommen und allgemein von der α -Untereinheit gesprochen.

3.3.3.1. Molekulargewichte

Mit Hilfe der Disc- und Mikro-Disc-Elektrophorese in SDS, sowie der analytischen Ultrazentrifuge in Kombination mit der Laser-Lichtstreuung konnten die Molekulargewichte der homogenen α - und β -Untereinheiten bestimmt werden. In der Disc-Elektrophorese wurden in Übereinstimmung mit der Literatur (128) Molekulargewichte von 58 000 für die α - und 55 000 für die β -Untereinheit gefunden (Abb. 15).

SDS-Mikrodisc-Elektrophorese-Experimente bestätigten die Molekulargewichte der α - und β -Untereinheiten und zeigten ferner ihre elektrophoretische Homogenität (Abb. 16).

Zur Berechnung der Molekulargewichte aus den $S_{20,w}^0$ -Werten wurden folgende analytische Ultrazentrifugationsexperimente durchgeführt.

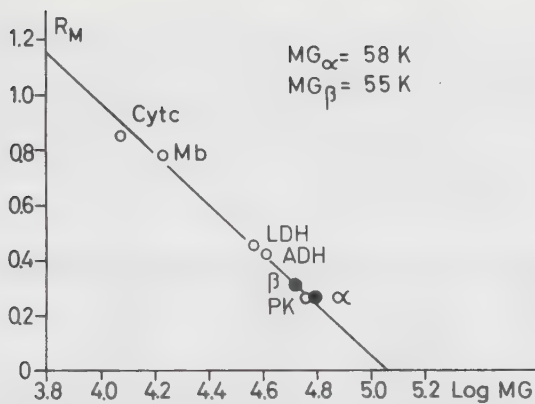


Abb. 15: Abhängigkeit der relativen Mobilität (R_M) vom Logarithmus des Molekulargewichtes (Log MG).

α - - β

Abb. 16:

SDS-Mikrodisc-Elektrophorese Gele der α - (links) und der β -Untereinheit (rechts) unter reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT).

Die durch Ultrafiltration konzentrierten und äquilibrierten Proteine wurden in Puffer (10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 2mM 2-Mercaptoäthanol, 0.1% SDS, pH 8.0) gelöst und bei 60.000 u.p.m. sedimentiert. Die α -Untereinheit sedimentierte bei $2.2 S_{20,w}^0$ (Abb. 17) und die β -Untereinheit bei $2.4 S_{20,w}^0$ (Abb. 18).

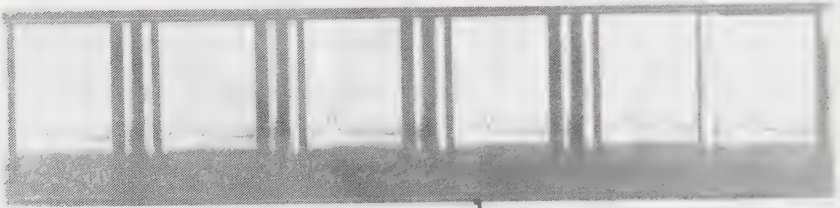


Abb. 17: Sedimentationsanalyse der α -Untereinheit (3.5 mg/ml) in der analytischen Ultrazentrifuge. Rotorgeschwindigkeit 60.000 upm, 25°C , Phasenwinkel 60° , Sedimentation von links nach rechts, Aufnahmen in 4 Min Intervallen, Schlierenoptik.

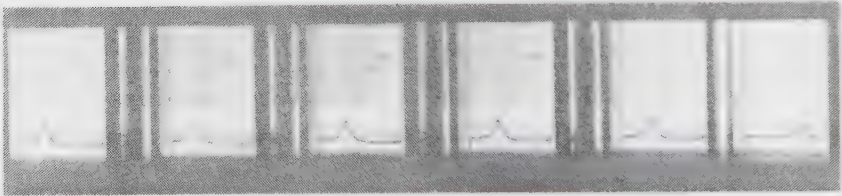


Abb. 18: Sedimentationsanalyse der β -Untereinheit (2.9 mg/ml) in der analytischen Ultrazentrifuge unter gleichen Bedingungen wie Abb. 17.

Die γ -Untereinheit (MG 34000) sedimentierte unter gleichen Bedingungen (2.2 mg/ml) bei $1.9 S_{20,w}^0$ ebenfalls als singulärer, symmetrischer Peak.

In Verbindung mit der Diffusionskonstante ($D_{20,W}^O(\alpha) = 3.38 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), die aus Laserlichtstreuungsexperimenten gewonnen wurde, konnte für die α -Untereinheit aus dem $S_{20,W}^O(\alpha) = 2.2$ ein Molekulargewicht von ca. 58000 berechnet werden. Die Bestimmung der Diffusionskonstanten von β und γ sind noch nicht abgeschlossen.

3.3.3.2. Isoelektrische Fokussierung

Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte (pI) der gereinigten Proteine wurde die isoelektrische Fokussierung in Mikrokapillaren durchgeführt. Die Proteine wurden in 8M Harnstoff gelöst und bei Raumtemperatur in 6% Polyacrylamidgelen fokussiert. Der pH Gradient wurde als linear angenommen und die pI -Werte direkt von den Mikrogelelen abgelesen. Es ergab sich für $pI_{\alpha} = 3.7$ und $pI_{\beta} = 4.0$. pI_{γ} konnte nicht exakt bestimmt werden, da die γ -Untereinheit sich nicht in eine scharfe Bande fokussieren ließ.

3.3.3.3. Endgruppen

Für die Endgruppenbestimmung wurden je 50 nmole Protein nach der Chang-Methode (140) mit dem DABITC-Reagens bzw. Phenylisothiocyanat umgesetzt und die markierten Aminosäuren mittels Mikro-Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Die PTH-Aminosäuren wurden mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeitschromatographen identifiziert. Zusätzlich zu diesen beiden Methoden wurde noch die Mikro-Dansylierung durchgeführt. Alle Methoden ergaben in Übereinstimmung für die α -Untereinheit Glycin und für die β -Untereinheit Alanin als N-Terminus.

Die α -Untereinheit war, wie schon oben erwähnt wurde, gegen Proteasentätigkeit sehr empfindlich und wurde leicht zu einem α' abgebaut. Dieses Bruchstück wurde isoliert und die N-terminale Aminosäure als Histidin nachgewiesen. Um noch weitere Beweise für die Richtigkeit der Analysen zu erhalten, wurden die N-terminalen Aminosäuren an der gesamten, in seine Untereinheiten dissoziierten F_1 -ATPase mittels Chang-Methode bestimmt (durchgeführt von Herrn Dr. R. Gregory). Neben den beiden Hauptbestandteilen (Gly, Ala) wurden noch Phe, Ile (Leu) und Glu gefunden.

Die C-terminalen Aminosäuren wurden durch Carboxypeptidase A-Spaltung ermittelt. Die isolierten Proteine wurden mit Carboxypeptidase A verdaut und alle 8 Min. äquivalente Proben entnommen und mit Hilfe eines Aminosäureanalysators untersucht.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

α -Untereinheit:

Zeit (Min)	Aminosäure (nMol)			
	Val	Ala	Leu	
0	0	0	0	
8	5.30	3.22	4.74	Val-(Ala/Leu)-
16	12.34	8.99	7.77	
24	25.64	22.95	23.98	

β -Untereinheit:

Zeit (Min)	Aminosäure (nMol)			
	Gly	Ala	Val	
0	0	0	0	
8	9.39	4.70	3.79	Gly-(Ala/Val)-
16	25.95	14.47	12.28	
24	25.91	22.97	17.17	

γ -Untereinheit:

Zeit (Min)	Aminosäure (nMol)		
	Ser	Ala	
0	0	0	
8	11.27	5.68	Ser-(Ala)-
16	26.63	6.31	

Tabelle 2: Zeitverlauf der Carboxypeptidasespaltung.

Zusammenfassend ergeben sich folgende C-terminale Aminosäuren: α (Val), β (Gly) und γ (Ser).

3.3.3.4. Aminosäureanalyse

Die Aminosäure-Analysen der gereinigten Untereinheiten wurden unter reduzierenden (1/2000 v/v 2-Mercaptoäthanol) sowie oxidierenden Bedingungen (Perameisensäure Oxidation) durchgeführt (Tabelle 3).

Aminosäure ^{a)}	α -Untereinheit		β -Untereinheit		γ -Untereinheit	
	nMol	Reste	nMol	Reste	nMol	Reste
Asx	296.54	56	26.61	52	50.22	31
Thr ^b	191.61	36	21.93	43	38.88	24
Ser ^b	222.18	42	15.32	30	55.42	34
Glx	338.16	64	29.71	57	60.31	37
Pro	153.39	29	17.85	35	26.24	16
Gly	370.94	70	31.11	61	61.58	38
Ala	327.73	62	28.60	55	48.31	30
Val ^c	292.84	55	30.77	59	35.64	22
Met	63.53	12	5.61	11	-	-
Ile ^c	187.92	35	18.46	36	29.16	18
Leu	391.41	74	26.51	51	38.87	24
Tyr	58.19	11	6.69	13	6.53	4
Phe	84.39	16	10.24	20	16.72	10
His	58.90	11	4.16	8	6.44	4
Lys	116.69	22	9.36	18	26.63	17
Arg	111.19	21	12.24	24	24.61	15
Cys ^d	5-11	1-2	-	-	6.59	4
Trp ^e	-	-	-	-	-	-
Molekular gewicht		58800		57800		33500
Aminosäure- anzahl		618		573		328
Polarität		40.8%		40.5%		49.4%

a) Mittelwerte aus den drei Hydrolyse-Zeiten (24, 48 und 72 h, 110°C).

b) Extrapolation der Zeit (t=0).

c) Erhalten aus der Hydrolyse bei 72 h.

d) Nach der Perameisensäure-Oxidation.

e) Nicht bestimmt.

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung der α , β und γ -Untereinheit.

Ein interessanter Unterschied zwischen den beiden großen Untereinheiten ist das Fehlen von Cystein in der β -Untereinheit. Der Lysin- und Methionin-Gehalt ist in beiden Untereinheiten ähnlich. Die γ -Untereinheit enthält im Vergleich zu den beiden großen Untereinheiten kein Methionin, jedoch einen gleichhohen Lysin-Gehalt. Mit ca. 40% Polarität sind beide großen Untereinheiten relativ hydrophob. γ hat einen etwas höheren Anteil an polaren Aminosäuren (Polarität 49.4%).

3.3.3.5. Spektroskopische Eigenschaften

Das Absorptionsspektrum der α -Untereinheit (Abb. 19) zeigte zwei Maxima (277 nm und 283 nm), das der β -Untereinheit ein Absorptionsmaximum bei 278 nm und eine Schulter bei 287 nm. Die Fluoreszenzspektren der α - sowie der β -Untereinheiten ergaben unterschiedliche Maxima im Emissionsspektrum bei 333 nm (α) bzw. 307 nm (β). Die Excitationsspektren waren dagegen ähnlich mit λ_{max} bei 285 nm (α) und 283 nm (β).

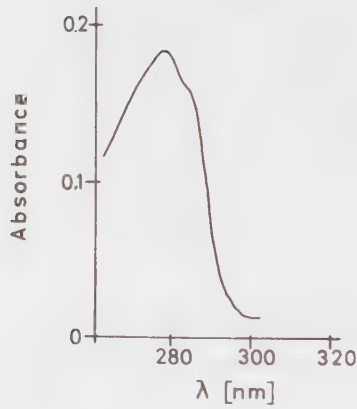
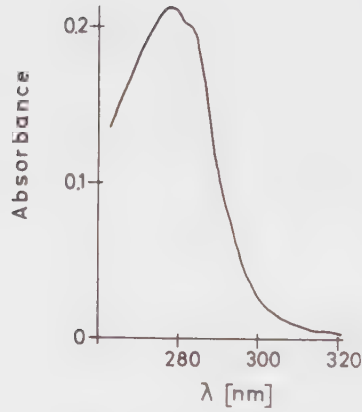


Abb. 19: Absorptionsspektrum der α - (oben) und β - (unten) Untereinheit. Proteinkonzentration: 1.2 mg/ml, Puffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0)

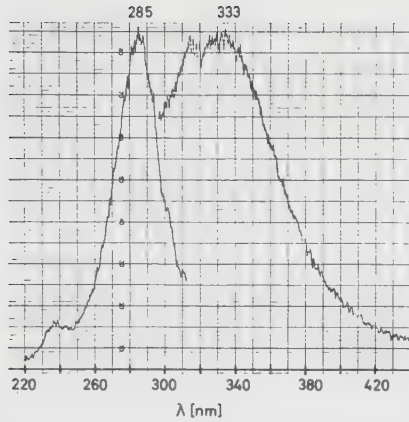


Abb. 20: Fluoreszenz-Spektrum der α -Untereinheit. Proteinkonzentration 0.34 mg/ml. Fluoreszenz-Excitationsspektrum (links) (Emission bei 333 nm) und Emission (rechts) (Excitation bei 285 nm).

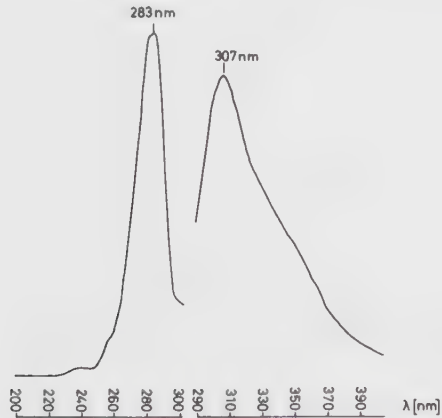


Abb. 21: Fluoreszenz-Spektrum der β -Untereinheit. Proteinkonzentration (0.24 mg/ml). Fluoreszenz-Excitationsspektrum (links) (Emission bei 307 nm) und Emission (rechts) (Excitation bei 283 nm).

3.3.3.6. Identität der Komponente X und der α -Untereinheit.

Die aufgereinigte Komponente, deren molekulare und spektroskopische Daten in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde, wurde zum einen elektrophoretisch mit F_1 -ATPase verglichen: Nur die Bande mit dem größten Molekulargewicht wurde verstärkt, welche definitionsgemäß die α -Bande ist. Zum anderen war auch das Molekulargewicht von X höher als das der isolierten β -Fraktion. Aus diesen Vergleichen ergibt sich eindeutig die Identität von α und X.

3.4. Mechanismus der Dissoziation und Renaturierung

Die Untersuchungen zur Ausarbeitung einer präparativen Darstellung der Untereinheiten führten zu einer Reihe von Beobachtungen, die einen Aufschluß über die offene Frage der topologischen Anordnung der Untereinheiten im F_1 -Komplex ergeben können. Ferner könnten sie die Frage der hydrolytischen Funktion und strukturellen Integrität des Komplexes beantworten helfen. Im folgenden werden die Ergebnisse dargestellt.

3.4.1. Enzymatische Aktivität bei Inaktivierung

Setzt man zur F_1 -ATPase in steigenden Konzentrationen GuHCl , LiCl und Harnstoff hinzu und untersucht nach verschiedenen Zeiten die Aktivität des Komplexes mit dem gekoppelten Enzymtest, so findet man eine Inaktivierung des Komplexes. Der unterschiedliche Einfluß der drei Agenzien auf die Inaktivierung über die Zeit ist in den Abbildungen 22 - 25 dargestellt. Die Abhängigkeit der F_1 -Aktivität nach Kältebehandlung ist in Abb. 25 demonstriert. Die Darstellung zeigt die stetige Abnahme der Enzymaktivität im Reaktionsverlauf. Bei Kälte von 0°C und einer Proteinkonzentration von $0.2 \text{ mg } F_1\text{-ATPase/ml}$ zerfällt das Molekül mit einer Halbwertszeit von etwa 50 Min. monoton.

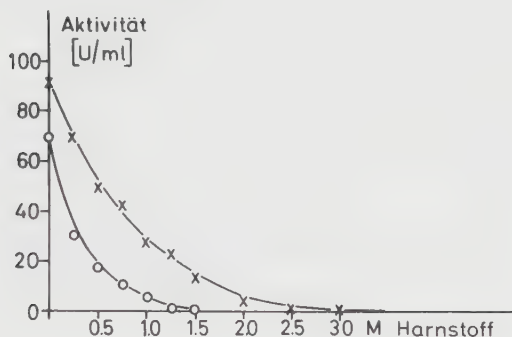


Abb. 22: Abhängigkeit der F_1 -Aktivität von der molaren Harnstoffkonzentration. Messung mit dem gekoppelten Enzymtest nach 0.5h (x) und 2.0h (o) Inkubation bei Raumtemperatur. Proteinkonzentration 0.14 mg F_1 /ml Inkubationslösung.

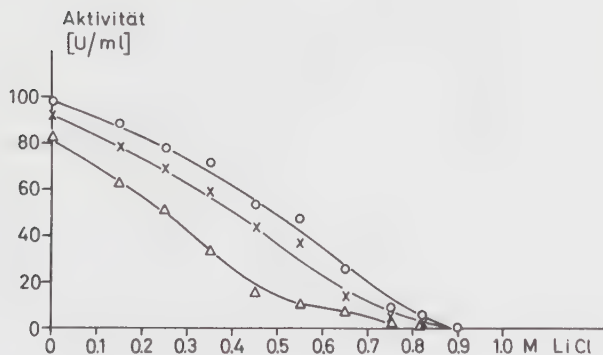


Abb. 23: Abhängigkeit der F_1 -Aktivität von der molaren LiCl-Konzentration. Messung mit dem gekoppelten Enzymtest nach 1.0h (o), 2.0h (x) und 4.0h (Δ) Inkubation bei Raumtemperatur. Proteinkonzentration 0.14 mg F_1 /ml Inkubationslösung.

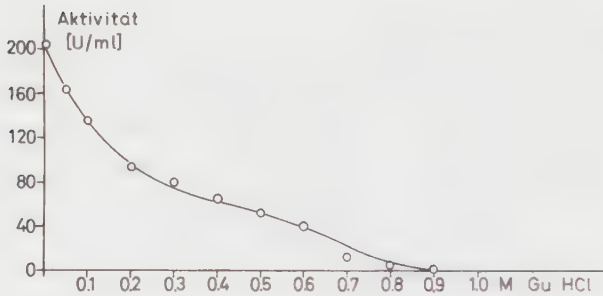


Abb. 24: Abhängigkeit der F_1 -Aktivität von der molaren GuHCl-Konzentration, Messung wie in Abb. 22, nach 15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur.

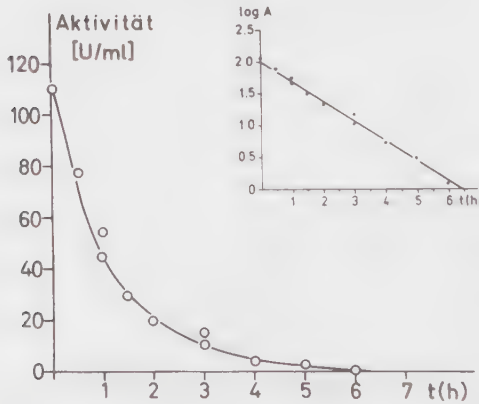


Abb. 25: Abhängigkeit der F_1 -Aktivität von der Zeit. Messungen nach 1-6h Inkubation bei 0°C. Proteinkonzentration 0.2 mg F_1 /ml Inkubationslösung (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0). Insert zeigt log A gegen die Zeit.

Die Denaturierungsagenzien hatten auf die im gekoppelten Enzymtest benutzten Enzyme keinen Einfluß. Zusätzlich wurden zur Aktivitätsbestimmung Kontrollexperimente mit dem pH-stat durchgeführt; sie bestätigten qualitativ die oben geschilderten Ergebnisse.

Man kann aus diesen Versuchen folgern, daß die Abspaltung der α -Untereinheit (siehe oben) zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt.

3.4.2. Laserlichtstreuung an der F_1 -ATPase

Lichtstreuung ist ein wichtiges Verfahren, um eine Vielzahl von Eigenschaften eines Makromoleküls in Lösung zu bestimmen: das Molekulargewicht und die Form des Moleküls ebenso wie seine Diffusionskonstante, Assoziations-Dissoziationsverhalten oder seine innere Dynamik (Molekülschwingungen). Dabei wird die Streuintensität einer Probe im Winkel θ relativ zum Primärstrahl mit einem Photomultiplier registriert. Das zeitliche Mittel der Streuintensität $\langle I \rangle$ ist proportional zum Molekulargewicht der gelösten Teilchen, während die Linienbreite der Rayleigh-Linie zusätzlich die Bestimmung der Diffusionskonstanten erlaubt. Aus den durchgeführten Messungen konnte wegen der vorhandenen Streugeometrie letztlich nur das relative Molekulargewicht (M_W) berechnet werden. Deshalb wurde das Molekulargewicht (M_O) der isolierten Proteine ohne GuHCl aus der Diffusionskonstanten der Lasermessung und aus der Sedimentationskonstanten der Ultrazentrifugation mit Hilfe der Svedberggleichung bestimmt. Des weiteren wurden Intensitätsmessungen an der F_1 -ATPase in Gegenwart von GuHCl durchgeführt, um den Dissoziationsprozess genauer studieren zu können. Im folgenden soll zunächst die Theorie näher erläutert werden, sofern sie für die strukturellen Untersuchungen von Bedeutung ist.

a) Theorie

Das relative Molekulargewicht (M_W) läßt sich aus der mittleren Streuintensität $\langle I \rangle$ bestimmen, denn nach der Rayleigh-Näherung gilt für eine polydisperse makromolekulare Lösung:

$$\frac{I}{I_O} = K \times \frac{M_W}{M_O} \quad [1]$$

I ist die gemessene Streuintensität, I_O die Streuinten-

sität des Referenzzustandes, M_0 das Molekulargewicht des Referenzzustandes und M_W das Gewichtsmittel der Komponenten in der Lösung: Das Gewichtsmittel ergibt sich aus

$$M_W = \sum c_i M_i / \sum c_i \quad [2]$$

wobei c_i die Konzentration der Komponente i in g/l, M_i deren Molekulargewicht ist.

K ist eine optische Konstante, die sich aus den Brechungsindices (n, n_0) und den refraktiven Index-Inkrementen (dn/dc) bzw. (dn_0/dc_0) der zu messenden Lösung und der Referenzlösung zusammensetzt.

$$K = \frac{n^2 (dn/dc)^2}{n_0^2 (dn_0/dc_0)^2} \quad [3]$$

Weiter kann aus der Linienbreite der Rayleigh-Linie bzw. aus der Korrelationsfunktion der Streuintensität [4] die Diffusionskonstante gemessen werden. Die Brown'sche Bewegung der Makromoleküle erzeugt eine lokale Modulation des Brechungsindex. Dadurch entstehen zeitliche Schwankungen der Streuintensität (I). Die Korrelationsfunktion der Streuintensität für eine monodisperse makromolekulare Lösung ist gegeben durch:

$$\langle I(0) \times I(t) \rangle = \langle I \rangle^2 \times (1 + e^{-2s^2 Dt}) \quad [4]$$

$I(0)$ ist die Intensität bei der Zeit $t = 0$, $I(t)$ ist die Intensität bei der Zeit t , D die Diffusionskonstante und s der Streuvektor [5].

$$s = \frac{4\pi n \sin \theta/2}{\lambda} \quad [5]$$

θ ist der Streuwinkel und λ die Wellenlänge. Die mittlere Streuintensität $\langle I \rangle$ (die Klammern bedeuten Mittelwerte) erhält man aus der Zahl der über ein Zeitintervall T gemittelten Photopulse.

Des weiteren ist die Korrelationszeit t mit der Diffusionskonstanten D über folgende Beziehung verbunden (148).

$$t = \frac{1}{2\zeta^2 D} \quad [6]$$

b) Experimente

Die Messungen an nativer F_1 -ATPase ergab einen Diffusionskoeffizienten von $2.97 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Daraus wurde mit einem $S_{20,w}^0$ -Wert von 12.6 ein Molekulargewicht von 400 000 Dalton berechnet, in Übereinstimmung mit früheren Daten (128).

Der Dissoziationsprozess der F_1 -ATPase in Gegenwart von GuHCl wurde wie folgt untersucht:

6.0 mg F_1 /ml Puffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0-7.0 M GuHCl, pH 8.0) wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die mittlere Streuintensität gemessen, wie in Abb. 26 dargestellt ist.

Die mittlere Streuintensität $I/I_0 \times 100$ als Funktion von der molaren Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration läßt sich in drei Bereiche (a - c) gliedern: Bis zu einer Konzentration von 1.4 M GuHCl dissoziierte der F_1 -ATPase-Komplex auf etwa 40% des ursprünglichen Molekulargewichtes (Bereich a). Zwischen einer GuHCl-Konzentration von 1.4 und 3.0 M existiert ein Plateau-Bereich (Bereich b, etwa 30%). Im Bereich c, oberhalb 3 M GuHCl findet man 10% des Molekulargewichtes (Abb. 26).

Aus diesen Versuchen können wir schließen, daß im Bereich a bei wenig veränderten Diffusionskoeffizienten parallel zur Dissoziation eine Auffaltung des Moleküls stattfindet. Aufgrund der Komplexität des nativen Moleküls ist eine Identifizierung des Dissoziationsproduktes noch nicht möglich. Es könnte sein, daß neben der freien α -Untereinheit präferentiell der α -freie F_1 -Komplex (F_1') vorliegt. Im Plateaubereich b findet offensichtlich nur

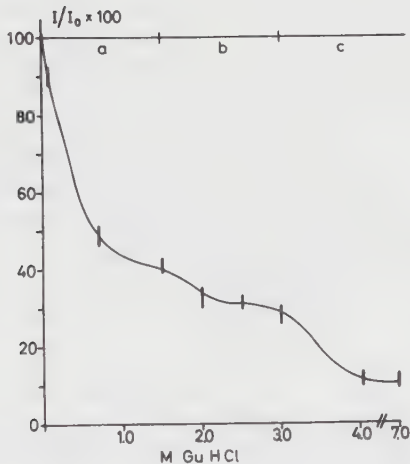


Abb. 26: Mittlere Streuintensität der F_1 -ATPase als Funktion der GuHCl-Konzentration.

eine geringe Dissoziation statt. Die Diffusion nimmt stark ab, das Molekül expandiert ohne wesentlich weiter zu zerfallen. Im Bereich c findet man vollkommene Dissoziation bei Vergrößerung der Diffusionskonstanten entsprechend einer starken und wahrscheinlich maximalen Auffaltung der einzelnen Untereinheiten.

Im Anschluß an diese Experimente wurde die Diffusion in Abhängigkeit von der molaren GuHCl-Konzentration gemessen. Wie aus der Abb. 27 ersichtlich ist, veränderte die Dissoziation im Bereich a den Diffusionskoeffizienten kaum. Im Plateaubereich b nimmt die Diffusionskonstante stark ab. Die vollständige Dissoziation oberhalb 3.0 M (Bereich c) vergrößert die Diffusionskonstante wieder.

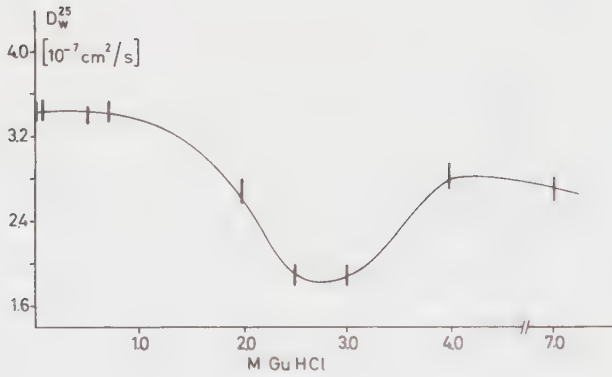


Abb. 27: Verlauf der Diffusionskoeffizienten der F_1 -ATPase als Funktion der GuHCl-Konzentration.

3.4.3. Untereinheiten - Dissoziation - Assoziation

Die reversible Abdissoziation der α -Untereinheit von der F_1 -ATPase wurde als Primärprozess der F_1 -Dissoziation durch Elektrophorese, Gelchromatographie und Aktivitätsmessungen nachgewiesen.

Nach der Inkubation von F_1 -ATPase (7.0 mg/ml) in der Kälte bei 4°C wurden innerhalb von 10 - 30 Min. drei Banden unter nicht-denaturierenden Bedingungen in der Mikrodisc-Elektrophorese festgestellt (Abb. 28). Zwei dieser Banden hatten ein Molekulargewicht im Bereich von 400 000 Dalton und eine Bande ungefähr 60 000 Dalton.

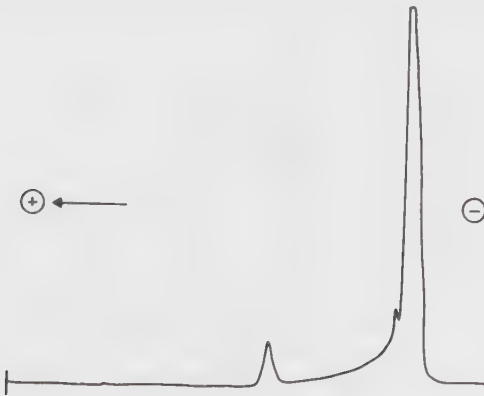


Abb. 28: Mikrodiscelektrophorese-Densitogramm der F_1 -ATPase. Inkubationszeit 10 Min., 4°C.

Dieser Prozess ist reversibel wie folgende Experimente zeigen. Das kältebehandelte Protein (erste Hälfte der kältebehandelten Probe) ergab in der Gelfiltration (Sephadex G100) ein Elutionsmuster, daß eine native F_1 -Bande und zwei zusätzliche Dissoziationsprodukte enthält (Abb. 29). Anschließend wurde die zweite Hälfte der kältebehandelten Probe 3 h bei 20°C erwärmt und die Gelfiltration unter gleichen Bedingungen wiederholt (Abb. 30). Die Dissoziationsprodukte waren weitgehend verschwunden: Es hatte sich F_1 -ATPase zurückgebildet. Diese Renaturierung wird auch durch die Zurückgewinnung der Enzymaktivität demonstriert (Abb. 31).

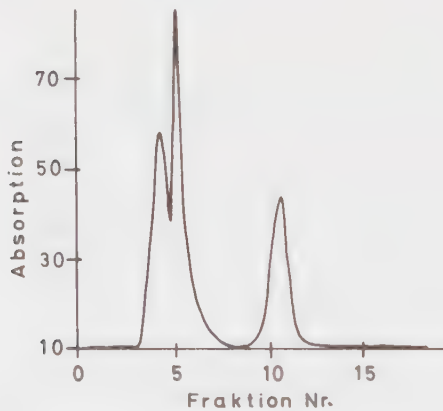


Abb. 29: Gelfiltration der kältebehandelten F_1 -ATPase bei 20°C , Inkubationszeit 30 Min. bei 4°C , Proteinkonzentration $7.0 \text{ mg } F_1/\text{ml}$ Puffer (5 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA , $\text{pH } 8.0$).

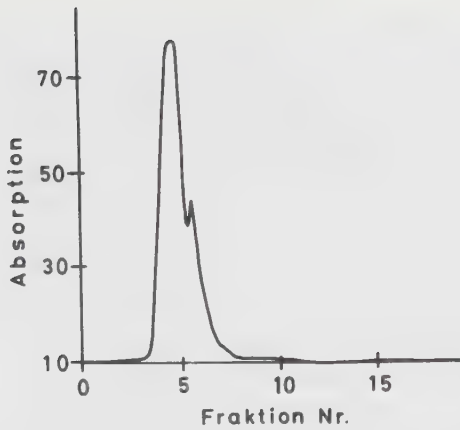


Abb. 30: Gelfiltration der reassozierten F₁-ATPase-Probe bei 20°C, Inkubation 3.0 h bei Raumtemperatur.

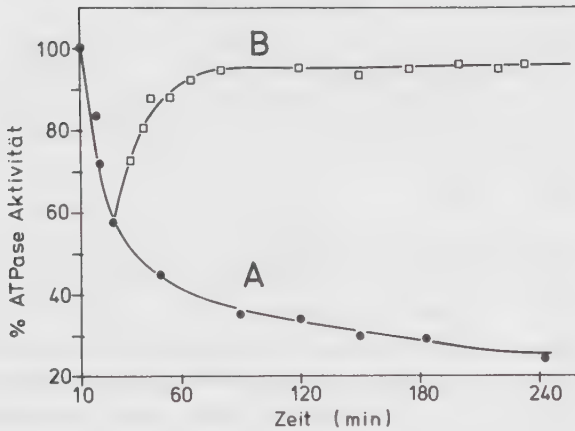


Abb. 31: ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit bei 4°C (A) und nach Reaktivierung bei Raumtemperatur (B).

4. Diskussion

Die F_1 -ATPase, das terminale Enzym der oxidativen Phosphorylierung, ist in seiner molekularen Struktur noch weitgehend unaufgeklärt. In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, das Enzym in seine Untereinheiten zu zerlegen, diese zu isolieren und zu charakterisieren.

Das präparierte Enzym (MG 400 000) war gemäß der Gelfiltration, der analytischen Ultrazentrifugation und der Laserlichtstreuung homogen. In der nicht-denaturierenden Elektrophorese wurden jedoch zwei zusätzliche Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ebenfalls um 400 000 Dalton gefunden. Der Anteil dieser beiden Banden am gesamten Protein der gereinigten F_1 -ATPase war so gering, daß eine weitere Aufreinigung nicht erforderlich war. Ferner wurden in der SDS-Elektrophorese zusätzlich zu den fünf Banden der F_1 -ATPase (α - ϵ) noch drei Proteinbanden entdeckt, die Proteolyseprodukte sein könnten: Diese Banden wurden nämlich durch Inkubation in GuHCl bzw. SDS verstärkt angereichert. Der Ursprung der Proteolyse ist unbekannt, jedoch konnte sie unter Bedingungen (unter Verwendung von Harnstoff, EDTA und Mercaptoäthanol) der Präparation der Untereinheiten fast vollkommen unterdrückt werden.

Zur Isolierung der Untereinheiten wurde zunächst erwogen, das F_1 -ATPase-Molekül durch hohe Harnstoff- bzw. GuHCl-Konzentrationen vollständig in seine Untereinheiten zu dissoziieren, um diese anschließend chromatographisch zu trennen. Es ergab sich jedoch rasch, daß die abdissoziierten Teile eine starke Tendenz zur Aggregation zeigten und somit ihre Trennung wesentlich erschwerten. Daher wurde versucht, durch niedrige Konzentrationen von Dissoziationsmitteln eine partielle Dissoziation zu erreichen mit dem Ziel, unter geeigneten Bedingungen die Abdissoziation einer einzigen Komponente möglich zu machen. Es

zeigte sich, daß dies der Fall ist, wobei die Dissoziation in GuHCl , LiCl , Harnstoff oder Kälte keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen. In allen Fällen dissoziierte die α -Untereinheit als erste Komponente vom F_1 -Molekül ab. Die ATP-Hydrolyse Aktivität verschwindet. Es läßt sich annehmen, daß der Dissoziationsmechanismus für alle angewandten Bedingungen im wesentlichen einheitlich ist.

Vergleicht man die einzelnen Dissoziationsverfahren miteinander, so hat die Kältebehandlung den Vorteil, daß die proteolytische Aktivität gehemmt wird. Außerdem braucht man keine Dissoziationsmittel zu benutzen, die sich im späteren Verlauf der Untersuchungen störend auswirken. Dies ist besonders der Fall bei Harnstoff und GuHCl , die sich nur sehr schwer durch Dialyse bzw. Gelfiltration vollständig entfernen lassen.

Die Fällung mit LiCl eignet sich wegen der leichten Entfernbarkeit des Salzes und der Abwesenheit proteolytischer Aktivitäten. Darüberhinaus hat es gegenüber der Kälteinkubation den Vorteil, daß sich durch leicht einstellbare Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse erhalten lassen.

Die partielle sequentielle Dissoziation des F_1 -Moleküls ist von Parametern wie Konzentration von LiCl , F_1 -Protein, der Temperatur des Puffermediums und dem pH abhängig.

Ausführliche elektrophoretische Untersuchungen zeigten, daß die abdissoziierte α -Untereinheit Aggregate im hochmolekularen Bereich bildete. Über die Art der für diese Aggregation verantwortlichen Wechselwirkungen kann im Augenblick nichts gesagt werden. Im Gegensatz zu der α -Untereinheit ist die Tendenz der isolierten β -Untereinheit zur Aggregation gering und ihre Löslichkeit gut. Die anderen Untereinheiten (γ, δ, ϵ) sind ebenfalls gut lös-

lich und konnten durch verschiedene Verfahren einheitlich abgetrennt werden. Folgendes Bild ergab sich nach Inkubation mit 1M LiCl: Am Beginn der Inkubation bei Raumtemperatur wird α abgespalten, während später auch γ elektrophoretisch nachweisbar ist.



Eine Alternative zur Elektrophorese wäre die präparative Isoelektrische Fokussierung. Dieses Verfahren ist allerdings wegen der Anwendung von Ampholyten kostspielig. Lediglich die kleinsten Untereinheiten δ und ϵ wurden nach diesem Verfahren präpariert.

Die Aminosäure Bausteinanalysen von α bzw. β sind mit den früher publizierten Ergebnissen - soweit die überhaupt aus reinem Material erhalten werden konnten - vergleichbar. Am besten stimmen die Analysen mit denen aus der TF_1 -ATPase von thermophilen Bakterien erhaltenen Daten überein (148). Auch die früher an Hefe erhaltenen Daten für die Untereinheiten α und β wurden an diesem jetzt vorliegenden homogenen Material bestätigt. Cystein wurde in α , γ und auch in δ gefunden. Aus genaueren Bestimmungen des Cystein-Gehalts dieser drei Untereinheiten sowie Gesamt- F_1 -ATPase ließe sich theoretisch die Stöchiometrie für diese Untereinheiten ableiten. Da es als sicher erscheint, daß α und β gleiche Stöchiometrie aufweisen, hätte man so auch den Wert für β . Jedoch sind die Daten aus der Aminosäure-Analyse nicht genügend genau, um definitiv die Stöchiometrie bestimmen zu können; sie sind aber kongruent mit einer 3:3:1:1:1 Verteilung. Die Arginin-, Lysin-, sowie die Methionin-Gehalte sind von beiden Untereinheiten ähnlich. Diese Gehalte sind für eine spätere Sequenzierung der isolierten Untereinheiten von Bedeutung. Mit chemischen Reagenzien (z.B. Bromcyan) und

spaltungsspezifischen Proteasen lassen sich für die Sequenzierung geeignete Bruchstücke darstellen. Eine Spaltung mit Bromcyan würde für die α 13 und für die β 12 Bruchstücke ergeben. Für die α -Untereinheit würde man im Falle einer Trypsin-Spaltung 44 und für die β -Untereinheit 43 Bruchstücke mit einem ungefähren Molekulargewicht von 1300 Dalton erwarten.

Das Fehlen von SH-Gruppen der β -Untereinheit scheint im Widerspruch zu mechanistischen Überlegungen zur Funktion der β -Untereinheit im katalytischen Zentrum von F_1 -ATPase zu stehen, die das Vorhandensein von SH-Gruppen auf dieser Untereinheit voraussetzen. Von anderer Seite ist auf die Bedeutung der Arginin-Residuen für die Funktion der F_1 -ATPase aufgrund von chemischen Substitutionsexperimenten hingewiesen worden. Da die Arginin-Reste in beiden Untereinheiten vorkommen, ist eine Lokalisation noch nicht möglich.

Physikalische Untersuchungen der Untereinheiten zeigten, daß die α -Untereinheit durch Einfluß von Hitze von einer nativen Proteinkonformation (α_N) in eine denaturierte Form (α_D) umgewandelt wird. Die Sedimentationsanalysen ergaben für α_N $2.6 S_{20,w}^O$ und für α_D $2.2 S_{20,w}^O$ (random coil). Deshalb fand sich in der letzten Konformation auch keine nachweisbare Helizität, was durch Circular-dichroismus überprüft wurde. Andere spektroskopische Daten wie z.B. die UV-Absorption und auch die Fluoreszenzspektren zeigten keine Besonderheiten.

Mechanistische Studien

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden ergeben einen ersten Einblick in den Mechanismus der Dissoziation - Assoziation und damit auch in den topologischen Aufbau der F_1 -ATPase. Alle Untersuchungen ergaben eindeutig, daß die Abdissoziation der α -Untereinheit der erste

Schritt der Zerfalls ist. Die Tatsache der Reversibilität unter Rückgewinnung der hydrolytischen Aktivität beweist, daß die Bindung der α -Untereinheit(en) an den F_1 '-Rest notwendig ist. Diese Vorstellungen werden durch die Laser-Lichstreuungsexperimente weiter unterstützt. Nimmt man für die F_1 -ATPase ein Molekulargewicht von 393000 Dalton, eine $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ Stöchiometrie und $K_i/K_o \sim 1$ an, so lassen sich nach [7]

$$\frac{I_M}{I_O} = \frac{\sum K_i c_i M_i}{K_o c_o M_o} = \frac{\sum n_i M_i^2}{n_o M_o^2} \quad [7]$$

folgende Intensitäten berechnen:

	Intensität		Konzentrationsbereich
	berechnet	gemessen	
1) $F_1 \rightarrow F_1' + 3 \alpha$	37%	39%	a(0-1.4M GuHCl)
2) $F_1 \rightarrow F_1'' + 3\alpha + \gamma$	29%	30%	b(1.4-3.0M GuHCl)
3) $F_1 \rightarrow 3\alpha + 3\beta + \gamma + \delta + \epsilon$	13%	11%	c(3.0-6.0M GuHCl)

Das heißt, daß unmittelbar nach der Abdissoziation der α -Untereinheit die γ -Untereinheit freigesetzt wird. In einem berechneten Modell treten Streuintensitäten von 37% für den ersten Bereich, von 29% für den zweiten Bereich und von 13% für den dritten Bereich auf in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen (Abb. 26). Die Berechnung schließt eine gemeinsame Abdissoziation der α - und β -Untereinheiten mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Die Bereiche a und b (39 und 30% Intensität) liegen so dicht beieinander, daß sie wahrscheinlich schwer voneinander separiert werden können. Ihre Kopplung ist von Parametern wie z.B. Temperatur, Dissoziationsmittel, Proteinkonzentration der F_1 -ATPase und der Inkubationszeit abhängig. Die Untersuchungen zeigten weiter, daß mit zunehmender GuHCl-Konzentration parallel

zur Abdissoziation der Untereinheiten eine Auffaltung des F_1 '-Moleküls eintritt, die vermutlich zu irreversibel aufgefalteten Bruchstücken und Untereinheiten führen.

Die Beobachtung der primären Abdissoziation der α -Untereinheit insbesondere in der Kälte weist auf ein topologisches F_1 -ATPase-Modell hin, das mit den in der Literatur dargestellten Modellen nicht in Übereinstimmung ist. Wir wissen aus Experimenten, daß die α -Untereinheit der OS-ATPase in den submitochondrialen Partikeln in der Kälte nicht spontan abdissoziiert. Im Gegensatz dazu finden wir eine spontane Abdissoziation der α -Untereinheit in der Kälte im isolierten F_1 -ATPase-Komplex. Wir meinen, daß sich daher die α -Untereinheit in der Nähe des als "stalk" definierten Molekülkomplexes befinden müßte, wie auf der Abb. 32a dargestellt ist. Diese Vorstellung wird dadurch gestützt, daß bislang keine drastischen Konformationsänderungen des F_1 -Komplexes in der OS-ATPase im Vergleich zur Chloroform-isolierten F_1 -ATPase gefunden worden sind. Weitere Untersuchungen sollen die Topologie des Komplexes klären (Abb. 32b).

Somit trifft das Modell a mit größerer Wahrscheinlichkeit zu, obwohl Modell b wegen fehlender Experimente an der OS-ATPase noch nicht ausgeschlossen werden kann.

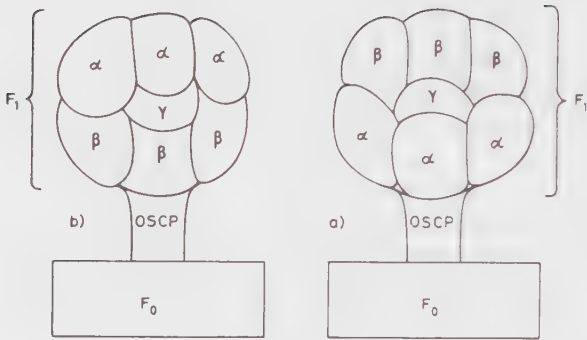


Abb. 32: Mögliche Anordnung der α -Untereinheiten in der F_1 -ATPase

5. Zusammenfassung

Die Untereinheiten (α, β, γ) der mitochondrialen F_1 -ATPase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden durch eine partielle Dissoziation mit LiCl und anschließender präparativer Elektrophorese isoliert. Die gereinigten in der SDS-Elektrophorese, Laserlichtstreuung und Ultrazentrifugation homogenen Untereinheiten hatten ein Molekulargewicht von 59000 Dalton für die α -, 55000 Dalton für die β - und 34000 Dalton für die γ -Untereinheit. Die Endgruppenanalyse ergab für die α -Untereinheit Glycin als N-terminus und Valin als C-Terminus. Die entsprechenden Aminosäuren für die β -Untereinheit sind Alanin und Glycin. In der Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich die beiden großen Untereinheiten nicht wesentlich. Beide haben einen relativ hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Polarität ca. 40%). Cystein wurde allerdings nur in α gefunden. Die Dissoziation mit LiCl, GuHCl und Kälte führte in allen Fällen vorwiegend zur Abspaltung der α -Untereinheit, was mit einer Inaktivierung verbunden war. Diese Dissoziation ist wie Aktivitätsmessungen und Gelfiltration zeigten, reversibel. Eine genauere Aufklärung dieses Vorgangs mit Hilfe der Laserlichtstreuung zeigte, daß die Dissoziation der F_1 -ATPase in drei definierten Stufen abläuft, erstens dissoziiert die α -Untereinheit ab, zweitens die α - und γ -Untereinheiten und drittens zerfällt der gesamte F_1 -ATPase Komplex in seine Untereinheiten.

Mit diesen Daten und mit den Daten aus der Literatur läßt sich ein Modell ableiten, bei dem die α -Untereinheit relativ exponiert bzw. am "stalk" lokalisiert ist.

6. Literatur.

- (1) Racker, E. (1965) Mechanisms in Bioenergetics, Acad. Press, New York.
- (2) Racker, E. (1968) Scient. Amer. 218, 32-39.
- (3) Racker, E. (1976) A New Look at the Mechanisms in Bioenergetics, Acad. Press, New York, London.
- (4) Kozlov, A. and Skulachev, V.P. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 463, 29-89.
- (5) Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Racker, E. and Slater, E.C. (1977) Ann.Rev.Biochem. 48,967-1026.
- (6) Pedersen, P.L. (1975) Bioenergetics 6, 243-275.
- (7) Baird, B.A. and Hammes, G.G. (1979) Biochim.Biophys. Acta, 549, 31-53.
- (8) Senior, A.E. (1973) Biochim.Biophys. Acta, 301, 249-277.
- (9) Penefsky, H.S. (1979) Adv. Enzymol. 49, 223-280.
- (10) Penefsky, H.S. (1974) in: The Enzymes (P.D. Boyer ed.) 10, 375 ff, Acad. Press, New York.
- (11) Fessenden-Raden, J.M. (1969) J.Biol.Chem. 244, 6662-6667.
- (12) Denhardt, D.T. (1979) Nature 280, 196-198.
- (13) Mitchell, P. (1961) Nature 191, 144-148.
- (14) Mitchell, P. (1977) Sympos.Gen.Mol.Biol. London.
- (15) Mitchell, P. (1976) J.theoret.Biol. 62, 327-367.
- (16) Green, D.E. (1974) Biochim.Biophys.Acta 346, 27-78.
- (17) Mitchell, P. (1973) FEBS Lett. 33, 267-272.
- (18) Mitchell, P. (1979) Eur. J. Biochem. 95, 1-20.
- (19) Ji, S. (1976) J. theoret.Biol. 59, 319-330.
- (20) Skulachev, V.P. (1977) FEBS Lett. 74, 1-12.
- (21) Boyer, P.D. (1975) FEBS Lett. 58, 1-6.
- (22) Mitchell, P. (1966) Biol.Rev. Cambridge Phil. Soc. 41, 445-502.
- (23) Tzagoloff, A. and Meagher, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7328-7336.
- (24) MacLennan, D.H. and Tzagoloff, A. (1968) Biochem. 7, 1603-1610.
- (25) Schatz, G., Penefsky, H.S. and Racker, E. (1967) J. Biol. Chem., 242, 2552-2560.
- (26) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) J.Biol. Chem. 235, 3322.

- (27) Brooks, J.C. and Senior, A.E. (1972) *Biochem.*, 11, 4675-4678.
- (28) Knowles, A.F. and Penefsky, H.S. (1972) *J.Biol. Chem.*, 247, 6617-6623.
- (29) Senior, A.E. and Brooks, J.C. (1970) *Arch.Biochem. Biophys.*, 140, 257-266.
- (30) Horstman, L.L. and Racker, E. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 1336-1344.
- (31) Catterall, W.A. and Pedersen, P.L. (1971) *F.Biol. Chem.*, 246, 4987-4994.
- (32) Lambeth, D.O. and Lardy, H.A. (1971) *Eur.J.Biochem.*, 22, 355-363.
- (33) Bragg, P.D. and Hou, C. (1972) *FEBS Lett.*, 28, 309-312.
- (34) Howell, S.H. and Moudrianakis, E.N. (1967) *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, 58, 1261-1264.
- (35) Kagawa, Y., Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. and Okamoto, H. (1976) *J. Biochem.*, 80, 141-151.
- (36) Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. and Racker, E. (1973) *J.Biol.Chem.*, 248, 2049-2055.
- (37) Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. and Racker, E. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250, 6541-6547.
- (38) Guarraia, L.J. and Peck, H.D.Jr. (1971) *J. Bact.*, 106, 890-895.
- (39) Klemme, B., Klemme, J.H. and SanPietro, A. (1971) *Arch.Biochem.Biophys.*, 144, 339-342.
- (40) Mirsky, R. and Barlow, V. (1971) *Biochim.Biophys. Acta*, 241, 835-845.
- (41) Schnebli, H.P., Vatter, A.E. and Abrams, A. (1970) *J.Biol. Chem.*, 245, 1122-1127.
- (42) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 74, 936-940.
- (43) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250, 7910-7916.
- (44) Bragg, P.D., Davies, P.L. and Hou, C. (1973) *Arch. Biochem.Biophys.*, 159, 664-670.
- (45) Sebald, W. (1977) *Biochim.Biophys.Acta*, 463, 1-27.

- (46) Nelson, N., Nelson, H. and Racker, E. (1972) J. Biol.Chem., 247, 7657-7662.
- (47) CaHell, K.J., Lindop, C.R., Knight, J.G. and Beechey, R.B. (1971) Biochem. J., 125, 169-177.
- (48) Fillingham, R.H. (1976) J.Biol.Chem., 251, 6630-6637.
- (49) Nelson, N., Eytan, E., Notsani, B.E., Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K. and Gitler, C. (1977) Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 74, 2375-2378.
- (50) Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) J.Biol.Chem. 238, 3762-3769.
- (51) Horstman, L.L. and Racker, E. (1970) J.Biol.Chem., 245, 1336-1344.
- (52) Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J. and Vignais, P.V. (1975) Biochim.Biophys. Acta, 387, 241-255.
- (53) Landry, Y. and Goffeau, A. (1975) Biochim.Biophys. Acta, 376, 470-484.
- (54) Ebner, E. and Maier, K.L. (1977) J.Biol.Chem., 252, 671-676.
- (55) Chan, S.H.P. and Barbour, R.L. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 430, 426-433.
- (56) Van de Stadt, R.J., de Boer, B.L. and Van Dam, K. (1973) Biochim.Biophys. Acta, 292, 338-349.
- (57) Van de Stadt, R.J. and Van Dam, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 347, 240-252.
- (58) Ernster, L., Juntti, K. and Asami, K. (1973) Bioenergetics 4, 149-159.
- (59) Nelson, N., Nelson, H. and Racker, E. (1972) J. Biol.Chem., 247, 7657-7662.
- (60) Hinkle, P. and Horstman, L.L. (1971) J.Biol.Chem., 246, 6024-6028.
- (61) Brooks, J.C. and Senior, A.E. (1971) Arch.Biochem. Biophys., 147, 467-470.
- (62) Asami, K., Juntti, K. and Ernster, L. (1970) Biochim.Biophys. Acta, 205, 307-311.
- (63) Ferguson, S.F., Harris, D.A. and Radda, G.F. (1977) Biochem. J., 162, 351-357.
- (64) Lang, D.R. and Racker, E. (1974) Biochim.Biophys. Acta, 333, 180-186.
- (65) Pedersen, P.L. (1979) J.Biol.Chem., 254, 3439-3443.
- (66) Tzagoleff, A. (1969) J.Biol.Chem., 244, 5027-5033.

- (67) Tzagoloff, A. (1970) J.Biol.Chem., 245, 1545-1551.
- (68) Tzagoloff, A. (1971) J.Biol.Chem., 246, 3050-3056.
- (69) Roy, H. and Moudrianakis, E.N. (1971) Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 68, 464-468.
- (70) Cantley, L.C. and Hammes, G.G. (1975) Biochem., 14, 2968-2975.
- (71) Tiefert, M.A., Roy, H. and Moudrianakis, E.N. (1977) Biochem., 16, 2396-2404.
- (72) Van der Meulen, D.L. and Govindjee, V. (1977) Eur.J. Biochem., 78, 585-598.
- (73) Recktenwald, D. (1978) Dissertation (Ruhr-Universität Bochum).
- (74) Girault, G. and Galmichi, J.M. (1977) Eur.J.Biochem., 77, 501-510.
- (75) Tzagoloff, A., Rubin, M.S. and Sierra, M.F. (1973) Biochim.Biophys. Acta, 301, 71-104.
- (76) Whittaker, P.A. (1979) in: Subcell.Biochem. (D.B. Roodyn ed.) 6, 197-198.
- (77) Slominski, P.P and Tzagoloff, A. (1976) Eur.J.Biochem., 61, 27-41.
- (78) Schatz, G. and Mason, T.L. (1974) Ann.Rev.Biochem., 43, 51-87.
- (79) Schatz, G. (1968) J.Biol.Chem., 243, 2192-2199.
- (80) Tzagoloff, A. and Meagher, P. (1971) J.Biol.Chem., 246, 7328-7336.
- (81) Avner, P.R., Coen, D., Dujon, B. and Slominski, P.P. (1973) Mol.Gen.Gen., 125, 9-25.
- (82) Foury, F. and Tzagoloff, A. (1976) Eur.J.Biochem., 68, 113-119.
- (83) Kovac, L. (1974) Biochim.Biophys.Acta, 346, 101-135.
- (84) Ebner, E., Mennucci, L. and Schatz, G. (1973) J. Biol.Chem., 248, 5360-5368.
- (85) Ebner, E. and Schatz, G. (1973) J.Biol.Chem., 248, 5379-5384.
- (86) Macino, G. and Tzagoloff, A. (1979) J.Biol.Chem., 254, 4617-4623.
- (87) Tzagoloff, A., Akai, A. and Needelmann, R.B. (1975) J.Biol.Chem., 250, 8236-8242.
- (88) Tzagoloff, A., Akai, A. and Foury, F. (1976) FEBS Lett., 65, 391-395.

- (89) Simoni, R.D. and Postma, P.W. (1975) *Ann.Rev.Biochem.*, 44, 523-554.
- (90) Cox, G.B. and Gibson, F. (1974) *Biochim.Biophys. Acta*, 346, 1-25.
- (91) Schairer, H.U., Friedl, P., Schmid, B.L. and Vogel, G. (1976) *Eur.J.Biochem.*, 65, 257-268.
- (92) Nelson, N., Maccicchini, M.L. Cote, C. Rubin, Y. and Schatz, G. (1979) *Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem.*, 360, 493-507.
- (93) Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J.Biol.Chem.*, 253, 3330-3336.
- (94) Vogel, G. and Steinhart, R. (1976) *Biochem.*, 15, 208-216.
- (95) Hanson, R.L. and Kennedy, E.P. (1973) *J.Bacter.*, 114, 772-781.
- (96) Penefsky, H.S. and Warner, R.C. (1965) *J.Biol. Chem.*, 240, 4694-4702.
- (97) Forrest, G. and Edelstein, S.J. (1970) *J.Biol.Chem.*, 245, 6468-6470.
- (98) Rosing, J., Harries, D.A., Kemp, A.Jr. and Slater, E.C. (1975) *Biochim.Biophys. Acta*, 376, 13-26.
- (99) Bruni, A., Frigeri, L. and Bigon, E. (1977) *Biochim.Biophys. Acta*, 426, 323-332.
- (100) Shirahashi, K. Hayakawa, S. and Sugiyawa, T. (1978) *Plant, Physiol.*, 62, 826-830.
- (101) Kuczenski, R.T. and Suelter, C.H. (1970) *Biochem.*, 9, 939-945.
- (102) Marston, S. (1978) *FEBS Lett.*, 92, 147-151.
- (103) Thurston, J.T., Burlington, R.F. and Meiningen, G.A. (1978) *Cryobiology*, 15, 312-316.
- (104) Schatz, G., Penefsky, H.S. and Racker, E. (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 2552-2560.
- (105) Lien, S., Berzborn, R.J. and Racker, E. (1972) *J.Biol.Chem.*, 247, 3520-3526.
- (106) Knowles, A.F. and Penefsky, H.S. (1972) *J.Biol.Chem.*, 247, 6617-6623.
- (107) Brooks, J.C. and Senior, A.E. (1972) *Biochem.*, 11, 4675-4678.
- (108) Nelson, N., Deters, D.W., Nelson, H. and Racker, E. (1973) *J.Biol.Chem.*, 248, 2049-2055.

- (109) Smith, J.B. and Sternweis, P.C. (1976) *Fed.Proc.*, 35, 1557-1560.
- (110) Younis, H.M., Winget, D. and Racker, E. (1977) *J.Biol.Chem.*, 252, 1814-1818.
- (111) Smith, J.B., Sternweis, P.C., Larson, R.J. and Heppel, L.A. (1976) *J.Cell.Physiol.*, 89, 567-568.
- (112) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977) *J.Biol.Chem.*, 252, 3480-3485.
- (113) Deters, D.W., Racker, E., Nelson, N. and Nelson, H. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250, 1041-1047.
- (114) Nelson, N. (1976) *Biochim.Biophys.Acta*, 456, 314-338.
- (115) Andreu, J.M. and Munoz, E. (1975) *Biochim.Biophys. Acta*, 387, 228-233.
- (116) Nelson, N., Kanner, B.I. and Gutnick, D.L. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 71, 2720-2724.
- (117) Futai, M., Sternweis, P.C. and Heppel, L.A. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 71, 2725-2729.
- (118) Kanner, B.I., Nelson, N. and Gutnick, D.L. (1975) *Biochim.Biophys.Acta*, 396, 347-359.
- (119) Höckel, M., Hulla, F.W., Risi, S. and Dose, K. (1976) *Biochim.Biophys.Acta*, 429, 1020-1028.
- (120) Forrest, G. and Edelstein, S.J. (1970) *J.Biol. Chem.*, 245, 6468-6470.
- (121) Smith, J.B. and Sternweis, P.C. (1975) *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 62, 764-771.
- (122) Salton, M.R.J. and Schor, M.T. (1972) *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 49, 350-357.
- (123) Nieto, M., Munoz, E., Carreira, J. and Andreu, J.M. (1975) *Biochim.Biophys. Acta*, 413, 394-414.
- (124) Carreira, J., Leal, J.A., Rojas, M. and Munoz, E. (1973) *Biochim.Biophys. Acta*, 307, 541-556.
- (125) Ryrie, I.J. and Jagendorf, A.T. (1972) *J.Biol.Chem.*, 247, 4453-4459.
- (126) McCarthy, R.E. and Fagan, J. (1973) *Biochem.*, 12, 1503-1507.
- (127) Slater, E.C., Kemp, A., Van der Kraan, I. Muller, J.L.M., Roveri, O., Verschoor, G.J., Wagenvoort, R.J. and Wielders, J.P.M. (1979) *FEBS Lett.*, 103, 7-11.
- (128) Takeshige, K., Hess, B., Böhm, M., Zimmermann-Telschow, H. (1976) *Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem.*, 357, 1605-1622.

- (129) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J.Biol.Chem.*, 235, 3322-3329.
- (130) Ebel, R.E. and Lardy, H.A. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250, 191-196.
- (131) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. (1951) *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275.
- (132) Gornall, A.G. Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949) *J.Biol.Chem.*, 177, 751-766.
- (133) Bradford, M.M. (1976) *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
- (134) Röchel, R. (1976) *J.Histochem.Cytochem.* 24, 773-791.
- (135) Righetti, P.G., Drysdale, J.W. (1976): *Laboratory Techniques* (T.S. Work and E. Work, eds.) 419-498, North Holland, American Elsevier.
- (136) Radola, B.J., Graesslin, D. (1977) *Electrofocussing and Isotachopheresis*, 121-252, W. de Gruyter, Berlin, New York,
- (137) Röchel, R. and Gross, J. (1979) *Anal.Biochem.*, 92, 91-98.
- (138) Maurer, H.R. (1971) *Disc-Elektrophoresis*, 44-51, W. de Gruyter, Berlin, New York.
- (139) Weber, K. and Osborn, M. (1969) *J.Biol.Chem.*, 244, 4406-4412.
- (140) Chang, J.Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B. (1978) *FEBS Lett.*, 93, 205-214.
- (141) Edman, P. (1950) *Acta Chemica Scandinavica* 4, 277-282.
- (142) Gray, W.R. (1972) *Methods in Enzymology* (C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, ed.) Vol. 25, 121-138, Acad. Press, New York.
- (143) Weiner, A.M., Platt, T. and Weber, K. (1972) *J. Biol.Chem.*, 247, 3242-3251.
- (144) Nirata, K., Matsuo, H. and Nakajima, T. (1975) In: *Protein Sequence Determination* (ed. S.B. Needleman) *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics* 8, 86-91 and 52-55. Springer Verlag, Berlin, New York.
- (145) Moore, S. (1963) *J.Biol.Chem.*, 238, 235-237.
- (146) Verschoor, G.J., Van der Sluis, P.R. and Slater, E.C. (1977) *Biochim.Biophys. Acta*, 462, 438-449.
- (147) Doster, W. (1979) *Dissertation*, Ruhr-Universität, Bochum.
- (148) Giri, L. Pon, C.L., Gualerzi, C., Doster, W. and Hess, B. (1979), *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 87, 976-982,
- (149) Yoshida, M., Sone, N. Hirata, H., Kagawa, Y and Ui, N. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9525-9533.

Lebenslauf

Ich wurde am 9. Juni 1951 als Sohn des Zimmermanns Josef Begusch und seiner Frau Elfriede Begusch (geb. Hradsky) in Klagenfurt (Österreich) geboren. Von 1957 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Krumpendorf von 1962 bis 1966 die Hauptschule und von 1966-1971 das Musisch-Pädagogische Bundesrealgymnasium in Klagenfurt.

Nach dem Abitur begann ich mit dem Studium der Technischen Chemie an der Technischen Hochschule in Graz (Österreich), wo ich im Februar 1974 die erste Diplomprüfung ablegte. Im Anschluß daran studierte ich Biochemie und Biochemische Technologie an der Technischen Universität in Graz. Nach Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: "Beiträge zur Aufklärung der Plasmalogenbiosynthese in anaeroben Mikroorganismen" am Institut für Biochemie legte ich die zweite Diplomprüfung ab, woraufhin mir der akademische Grad eines Diplomingenieurs (Dipl.Ing.) am 18. Juni 1976 verliehen wurde. Seit September 1976 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in Dortmund unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Benno Hess an der vorliegenden Dissertation.

1976 heiratete ich die Diplom-Krankenschwester Eva Eugster. Wir haben einen Sohn, Robert-Martin.

Dank

Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Benno Hess, danke ich für die gute Betreuung, für viele wertvolle Anregungen und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Frau M. Böhm, Herrn Dr. W. Doster, Herrn Dr. M. Engelhard, Herrn Dr. R. Gregory, Herrn Dr. D. Recktenwald, Herrn Dr. R. Rüchel und Frau Dr. H. Zimmermann-Telschow bin ich für wertvolle Hinweise und Diskussionen dankbar.

Ferner danke ich Herrn Dr. W. Doster für die Durchführung der Lichtstreuungsexperimente, Herrn Dr. M. Engelhard für das Überarbeiten und Korrigieren des Manuskriptes, Herrn Dr. R. Gregory für die Durchführung der Kontrollanalysen und der N-terminalen Aminosäuren, Herrn Dr. J. Watters für die CD-Experimente und Frau H. Rahn für die Anfertigung der Zeichnungen, sowie Frau G. Gerhards für die Durchführung der fotografischen Arbeiten.

Weiteres möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts sowie ganz besonders Frau U. Schacknies und Frau M. Wieck für die technische Unterstützung danken.

Herrn Dr. D. Schäfer vom Institut für Systemphysiologie danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ich danke der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Förderung des Projektes.

Offaetdruck
GmbH & Co. KG

96 Bamberg Hohe-Kreuz Str. 9b

M. SCHADEL

• Tel. 0951/54414 • 58461 •